AUS DEM ROBERT KOCH-INSTITUT
DES BUNDESGESUNDHEITSAMTES
FACHGEBIET KLINISCHE PARASITOLOGIE

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER IMMUNITÄT AUF DEN VERLAUF DER ACANTHAMOEBA-INFEKTION

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
DIPL. BIOL. CHITTARANJAN BHADURI
aus
KALKUTTA, INDIEN

Berlin 1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0039

AUS DEM ROBERT KOCH-INSTITUT DES BUNDESGESUNDHEITSAMTES

FACHGEBIET KLINISCHE PARASITOLOGIE

UNTERSUCHUNGEN OBER DEN EINFLUSS DER IMMUNITÄT AUF DEN VERLAUF DER ACANTHAMOEBA-INFEKTION

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
DIPL. BIOL. CHITTARANJAN BHADURI
aus
KALKUTTA, INDIEN

Berlin 1986

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Janitschke
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Niemitz

Promoviert am 5.3.1986

Die vorliegende Dissertation wurde unter Leitung von Herrn Direktor Prof. Dr. K. Janitschke im Robert-Koch-Institut, Abteilung Klinische Parasitologie, angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Janitschke für die Themenstellung und die umfassende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. C. Niemitz, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, für seine wertvolle Unterstützung und seine Anregungen meinen Dank aussprechen. Herrn Prof. Dr. H. Werner, jetzt emeritiert, bin ich zu großem Dank verpflichtet für sein reges Interesse an meiner Dissertation.

Herrn Dr. J.F. DeJonckheere, Brüssel/Belgien und Frau Dr. H. Janzeen, Heidelberg, danke ich für die freundliche Bereitstellung der Acanthamoeba-Stämme.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. K.N. Masihi, Abteilung Virologie des Robert-Koch-Instituts, der mir BCG, MDP und TDM zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Laboratoriumsgruppe Klinische Parasitologie, insbesondere Frau S. Lichy, für ihre hilfreiche Mitarbeit danken.
Frau U. Sauter, AG Humanbiologie der Freien Universität Berlin, gebührt mein Dank für ihre freundliche Hilfe bei der Durchführung der histologischen Arbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Einführung	1
1.2. Morphologie und Klassifizierung von Acanthamoeba und Naegleria	1
1.3. Ökologie und Epidemiologie	3
1.4. Probleme der Pathogenität der Amöben	7
1.5. Immunität des Wirtes gegenüber einer Amöbeninfektion	9
1.6. Fragestellung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Oberblick	14
2.2. Kulturverfahren	15
2.3. Versuchstiere	16
2.4. Plattentest	16
2.5. Histologische Untersuchung	18
2.6. Durchführung der Immunisierungsversuche	20
2.6.1. Anzucht eines virulenten Amöbenstamms	20
2.6.2. Immunisierung mit definierten, weitgehend apathogenen Amöbenarten und -stämmen und Belastung mit einem lebenden, für Mäuse pathogenen Stamm	22
2.6.3. Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Antigenen aus definierten apathogenen und pathogenen Amöbenstämmen und Belastung mit einem lebenden pathogenen Stamm	23
2.6.4. Immunisierung mit Oberständen aus Amöbenkulturen	25
2.6.5. Beeinflussung der Immunreaktion durch verschiedene Erreger	27

Seite

2.6.6. Immunisierung mit Bakterienzellwandantigen (MDP, TDM) 29
2.6.7. Beeinflussung der Immunreaktion durch Immunsuppressiva 31

3. ERGEBNISSE 34

3.1. Immunisierung mit definierten, weitgehend apathogenen Amöbenstämmen und Belastung mit einem lebenden pathogenen Stamm 34
3.2. Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Antigenen aus definierten apathogenen und pathogenen Amöbenstämmen und Belastung mit einem lebenden pathogenen Stamm 37
3.3. Immunisierung mit Überständen aus Amöbenkulturen 40
3.4. Beeinflussung der Immunreaktion durch verschiedene Erreger 43
3.5. Immunisierung mit Bakterienzellwandantigenen 46
3.6. Beeinflussung der Immunreaktion durch Immunsuppressiva 48

4. DISKUSSION 51

4.1. Immunisierung mit lebenden Amöben 51
4.2. Immunisierung mit abgetöteten Amöben 53
4.3. Immunisierung mit Überständen aus Amöbenkulturen 56
4.4. Mechanismen der Immunreaktion im Wirt nach einer Immunisierung durch lebende, abgetötete Amöben bzw. Amöbenkulturüberstand 58
4.5. Beeinflussung der Immunreaktion durch verschiedene Erreger 61
4.6. Immunisierung mit Bakterienzellwandantigenen (MDP, TDM) 64
4.7. Beeinflussung der Immunreaktion durch Immunsuppressiva 66

	Seite
5. SCHLUSSBEMERKUNG	70
6. ZUSAMMENFASSUNG	73
7. SUMMARY	75
8. LITERATURVERZEICHNIS	77
9. ANHANG	92

1. EINLEITUNG

1.1. Einführung

Freilebende Amöben der Gattung Naegleria und Acanthamoeba kommen überall in unserer Umwelt vor, im Boden wie auch im Wasser und sind häufig auch auf den Schleimhäuten des Nasenrachenraumes gesunder Menschen zu finden. Seit mehr als zwei Jahrzehnten widmen ihnen Parasitologen und Immunologen besondere Aufmerksamkeit, denn einige Arten der Gattung Naegleria und Acanthamoeba können - als potentielle Gewebeparasiten des Menschen - durch ihr cerebrotropes Verhalten hochpathogen wirken und Meningoencephalitis bzw. Encephalitis mit häufig tödlichem Ausgang hervorrufen. Daneben verursachen Acanthamoeba auch chronische Erkrankungen anderer Organe, z. B. der Augen oder der Lunge.

1.2. Morphologie und Klassifizierung von Acanthamoeba und Naegleria

Bereits im vorigen Jahrhundert befaßten sich einige Protozoologen mit freilebenden Amöben, so EHRENBERG im Jahre 1838 und DUJARDIN im Jahre 1841[36], die aufgrund der Morphologie versuchten, diese Protozoen systematisch einzuordnen.
Freilebende Amöben sind Einzeller und gehören zur Klasse der Rhizopoda; charakteristisch für sie ist die Ausbildung von Pseudopodien.
Man unterscheidet zwei Lebensformen, die als Trophozoit bezeichnete vegetative Form und die Zystenform. Naegleria besitzt außerdem die Fähigkeit zur Veränderung der Körpergestalt: unter bestimmten Bedingungen werden in der vegetativen Form sogenannte Geißelstadien ausgebildet.

Während die Zysten die inaktive Dauerform darstellen, in der die Amöben über längere Zeit hindurch unter ungünstigen Umständen überleben können, sind sie in der vegetativen Form aktiv; Bewegung und Nahrungsaufnahme erfolgt mithilfe von Pseudopodien oder durch Vorwärtsströmung der ganzen Plasmamassen. In dieser Form findet auch die Vermehrung statt.

In der Trophozoitenform sind sowohl Naegleria als auch Acanthamoeba in Form und Größe variabel. Der Durchmesser der Trophozoiten beträgt bei Naegleria 10 - 15 µm, bei Acanthamoeba 25 - 35 µm. Beide besitzen ein granuliertes Cytoplasma mit Vakuolen und einen runden Kern. Die Zystenform erscheint bei Naegleria kugelig; in der einschichtigen Zellwand der Zyste sind Poren zu erkennen. Bei Acanthamoeba ist die Zellwand dagegen doppelschichtig und besitzt Sternenform.
Naegleria und Acanthamoeba unterscheiden sich in ihrer Trophozoitenform vor allem im Hinblick auf ihre Bewegungsweise sowie den Ablauf ihrer Mitosen. Naegleria bewegt sich gleichmäßig gleitend fort, für Acanthamoeba ist eine sehr langsame Bewegung mit Ausbildung von Acanthopodien charakteristisch. Beide Gattungen unterscheiden sich weiterhin durch den Aufbau des Spindelapparates. Während der Mitose bleibt bei Naegleria der Nucleolus und die Kernmembran bestehen, bei Acanthamoeba hingegen geht die Mitose unter Auflösung von Kernhülle und Nucleolus vor sich.
Bis heute ist man sich über die genaue taxonomische Einordnung der freilebenden Amöben nicht einig. Allgemein werden sie der Klasse Rhizopoda, Unterordnung Amoebida, zugeordnet.
PAGE nimmt die Klassifizierung aufgrund der Bewegungsweise, der cytochemischen Eigenschaften sowie der Form der Zysten vor. Daher hält er Naegleria und Acanthamoeba für eigenständige Gattungen (PAGE, 1967)[78 & 79]. SINGH stützt seine Klassifizierung der Amöben auf den Ablauf der mitotischen Teilung; daher sieht er Acanthamoeba nicht als Gattung an,

sondern ordnet sie als Arten der Gattung Hartmanella zu (SINGH & DAS, 1970)[93].

1.3. Ökologie und Epidemiologie

Akanthamöben und Naeglerien kommen in der Erde, oft aber auch im Wasser der Seen und in Flüssen vor. Da sie ungünstige Bedingungen, wie Trockenperioden, in Zystenform überdauern, findet man diese Form vor allem im trockenen Boden oder im Staub. Geraten die Zysten in ein feuchtes Medium, gehen sie oft wieder in die Trophozoitenform über, besonders wenn ein chemischer Anreiz - häufig die Anwesenheit von Bakterien, z. B. Escherichia coli oder nahe verwandte Arten - gegeben ist (CRUMP, 1950)[22].
SINGH vertritt die Ansicht, daß die Amöben, wie einige andere Klassen der Protozoen, z. B. Ciliaten oder Flagellaten, nicht aktiv schwimmen können, sondern auf einen festen Untergrund angewiesen sind, auf dem sie sich bewegen, ernähren und vermehren. Als Nahrung dienen andere Mikroorganismen, in erster Linie Bakterien (SINGH & DUTTA, 1984)[96].
Aufgrund der Untersuchungen von SCHAUDINN (1903)[89] kamen die meisten Forscher zu der Überzeugung, daß Entamoeba histolytica, der Erreger der Amöbenruhr, die einzige für den Menschen pathogene Amöbenart sei. WELLS (1911)[106] untersuchte daraufhin, ob auch freilebende Amöben, die im Staub, in der Luft oder auf Lebensmitteln vorkommen, imstande seien, eine Amöbendysenterie zu verursachen. WELLS kam zu dem Ergebnis, daß freilebende Amöben keine Amöbenruhr hervorrufen können, da er bei Stuhluntersuchungen die Zystenform unverändert vorfand. Züchtete er die Zysten anschließend in Kulturmedien weiter, wandelten sich diese Zysten jedoch in die Trophozoitenform um.

Im Gegensatz zu den Darmamöben, die zur Aufrechterhaltung

und Deckung ihres Lebenszyklus auf einen Wirt angewiesen sind, nannte man diese Amöben freilebend, da sie von einem Wirtsorganismus unabhängig sind.
CASTELLANI kam 1930[12] durch die Beobachtung einer Hefekultur, die von Akanthamöben kontaminiert war, zu dem Schluß, daß freilebende Amöben nicht nur saprophytisch, sondern auch als Parasiten existieren können.
Diese Ansicht wurde auch von JAHNES et al. (1957)[53] vertreten, die ebenfalls eine Kontamination einer Zellkultur mit freilebenden Amöben nachwiesen.

CULBERTSON et al. (1958)[23] äußerten aufgrund ihrer Beobachtungen als erste die Vermutung, daß Akanthamöben auch beim Menschen Meningitis-Erkrankungem mit tödlichem Ausgang verursachen könnten. In einer Zellkultur hatte CULBERTSON einen cytopathogenen Effekt festgestellt, den er auf eine Virusinfektion zurückführte. Mit dieser seiner Meinung nach von einem Virus befallenen Kultur infizierte er intracerebral einige Affen und Mäuse. Nachdem als Folge dieser Behandlung einige Tiere an Meningitis gestorben waren, konnte CULBERTSON aus deren Gehirnen Amöben isolieren. Es handelte sich sowohl bei den in der Zellkultur gefundenen wie auch bei den aus den Gehirnen angezüchteten Amöben um Akanthamöben, die CULBERTSON ursprünglich für A. castellanii hielt.

Erste Berichte über tödlich verlaufende Meningoencephalitisfälle bei Menschen kamen 1965 aus Australien (FOWLER & CARTER, 1965)[42]. Bereits ein Jahr später wies BUTT in den USA ebenfalls auf Fälle von Meningoencephalitis hin (BUTT, 1966)[7]. In der Rückenmarksflüssigkeit der an eitriger Encephalitis Erkrankten fanden sich bewegliche Amöben. Diese durch Amöben verursachte Krankheit wurde zuerst von BUTT "primäre Amöben-Meningoencephalitis (PAM)" genannt. Die Bezeichnung "primär" drückt den Unterschied zu einer sogenannten "sekundären" aus, die durch eine andere Amöbenart, Entamoeba histolytica, in seltenen Fällen hervorgerufen wird, wenn diese Amöben auf hämatogenem Weg ins

Gehirn eindringen und eine extraintestinale Amoebiasis bewirken.

Zu der Erkrankung durch primäre Amöben-Meningoencephalitis kam es durch einen Befall der Riechschleimhaut mit freilebenden Amöben. Anschließend wurde der Bulbus olfactorius befallen, und die Amöben drangen bis zu den Frontallappen des Kleinhirns vor. Als Infektionsquelle galt enger Kontakt mit Süßwasser, in dem Amöben vorhanden waren. Die ursprüngliche Annahme, daß es sich bei den Erregern um Akanthamöben handelte, wurde nicht bestätigt. Anschließende Untersuchungen ergaben, daß für diese Erkrankungen Naeglerien (Naegleria fowleri) verantwortlich waren (MARTINEZ & JANITSCHKE, 1979)[70]. Daß jedoch Akanthamöben ebenfalls PAM verursachen können, wiesen PATRAS und ANDRUJAHR (1966)[81] nach, die über einen Fall aus Texas berichteten.
Im Gegensatz zu Naegleria fowleri rufen Akanthamöben eine Encephalitis mit längerem klinischen Verlauf hervor, und zwar unabhängig von wassersportlichen Aktivitäten; außerdem fällt auf, daß sie vorwiegend geschwächte Personen befallen. Im klinischen Verlauf und pathologischen Bild einer Infektion durch die beiden Amöbenarten zeigen sich deutliche Unterschiede. So handelt es sich bei der Akanthamöben-Infektion auch nicht um eine "primäre Meningoencephalitis", sondern um eine granulomatöse Amöbenencephalitis (GAE) (MARTINEZ, 1982)[72].
Akanthamöben-Infektionen können neben dem Gehirn auch andere Organe betreffen, z. B. Auge, Lunge, Haut, Niere.

Nach der Entdeckung von PAM und GAE wurde aus vielen Ländern der Welt von Erkrankungen durch freilebende Amöben berichtet. Bis heute weiß man von 130 Fällen von Naegleria-Infektionen und 30 von Akanthamöben-Infektionen (MARTINEZ, 1983)[73]. Die Mehrzahl der Fälle wurde in den USA beobachtet, nämlich 49 PAM und 16 GAE. Aus Europa kamen Berichte von Erkrankungen, zum Beispiel aus Belgien, Großbritannien und der CSSR. Auch aus Asien, Afrika und Süd-

amerika sind Krankheitsfälle bekannt.

Hauptinfektionsquelle für die PAM war erwärmtes Wasser. So stellte es sich bei 16 aus der CSSR berichteten Fällen heraus, daß die erkrankten Personen zwar aus 10 verschiedenen Städten oder Kreisen stammten, jedoch alle mit dem gleichen geheizten und gechlorten Wasser desselben Schwimmbades in Kontakt gekommen waren (CERVA et al., 1968)[13].
Andererseits wiesen LAWANDE et al. (1979, 1980)[65;66] in Zaria in Nigeria auch auf der Nasenschleimhaut gesunder Personen freilebende Amöben nach. Sie führten ihre Untersuchungen während der Trockenperiode des Sommers durch, in einer Zeit also, da durch starken Wind der Staub aufgewirbelt wird, und es ist zu vermuten, daß dadurch die Amöben auf die Nasenschleimhaut der Menschen gelangten. Auch hier traten Fälle von Amöbenmeningitis auf.
Der älteste Fall einer Amöbenmeningitis kann für das Jahr 1909 bezeugt werden. SYMMERS (1969)[99] stieß im Zusammenhang mit Aufräumungsarbeiten im Pathologischen Museum in London auf ein Gehirnpräparat, das dort seit 60 Jahren lagerte. In diesem konnte er Amöben nachweisen, die morphologisch nicht von Naegleria fowleri zu unterscheiden waren.
Auch bei Tieren sind Erkrankungen durch freilebende Amöben beobachtet worden, z. B. bei Hunden, Schafen oder Wasserbüffeln (DWIVEDI & SINGH, 1965; AYERS et al., 1972)[37,4].

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß freilebende Amöben überall auf der Erde vorkommen. Doch, obwohl von allen Kontinenten über Erkrankungen beim Menschen berichtet wurde, muß festgestellt werden, daß die Zahl der Erkrankungen insgesamt sehr klein ist.

Diese Diskrepanz kann entweder im Parasiten oder im Wirt begründet sein.

1.4. Problem der Pathogenität der Amöben

Innerhalb der beiden oben genannten Amöbengattungen sind verschiedene Arten beschrieben worden. Von diesen werden Naegleria fowleri und Acanthamoeba culbertsoni als pathogen für den Menschen angesehen. Als pathogen gelten darüber hinaus noch einige andere Arten der Akanthamöben, z. B. A. polyphaga, A. castellanii und bei Naeglerien N. australiensis. Es ist noch nicht eindeutig geklärt, welche biochemischen oder molekularbiologischen Faktoren bei der Virulenz der Amöben eine Rolle spielen. Vermutet wird, daß die Pathogenese der Amöben darauf beruht, daß während der Wachstumsphase phospholipide Lysozyme von den Trophozoiten abgegeben werden, die eine rapide Plasmolyse der Epithelzellen bewirken (CHANG, 1971)[17]. Einige Autoren nehmen an, daß Phospholipase A eine Rolle bei der Pathogenität von Amöben spielt (ELSON et al., 1970)[38]. MISRA et al. (1983)[77] ermittelten in ihren Experimenten, daß diejenigen Akanthamöbenarten bzw. -stämme, die bei Mäusen pathogen wirkten, im Vergleich zu apathogenen Amöbenarten eine hohe Phospholipase A-Aktivität aufwiesen.
CARTER (1972)[11] vertrat die Meinung, die Pathogenität von Naegleria fowleri sei auf Mutationen zurückzuführen. Seiner Meinung nach sind bestimmte Eigenschaften, wie z. B. veränderte Toleranz gegenüber hohen oder niedrigen Temperaturen, als ökologische Anpassung anzusehen, andere Eigenschaften seien jedoch genetisch bedingt. Da die meisten Infektionen in der warmen Jahreszeit oder nach einem Aufenthalt in beheizten Schwimmbädern auftraten, sahen mehrere Forscher einen Zusammenhang zwischen der Pathogenität der Amöben und der Temperaturtoleranz. GRIFFIN (1972)[48] befaßte sich mit der Temperaturtoleranz bei pathogenen und apathogenen Amöben. Seine Untersuchungen ergaben, daß Naegleria fowleri auch noch bei verhältnismäßig hohen Temperaturen wuchsen, die um einiges höher lagen als die bei Menschen gemessenen Fiebertemperaturen. Nichtpathogene Naegleria-Amöben hingegen

wuchsen nicht mehr, wenn die Temperatur höher stieg als die normale Körpertemperatur des Menschen. Eine ähnliche Erscheinung wurde auch bei Akanthamöben beobachtet. So wuchsen die bei Mäusen hochvirulenten Akanthamöben bei höheren Temperaturen weiter, während die nichtpathogenen Akanthamöben sich nicht mehr vermehrten.
Die Bedeutung dieser Tests ist jedoch inzwischen fraglich geworden, da beobachtet wurde, daß einige Arten von apathogenen Amöben auch bei verhältnismäßig hohen Temperaturen noch wachsen (STEVEN et al., 1977)[98]. BROWN und CURSON (1977) isolierten andererseits für Mäuse pathogene Akanthamöben aus dem Eis zugefrorener Gewässer in der Umgebung von Oslo in Norwegen.
JONCKHEERE (1978)[30] wies darauf hin, daß die Virulenz bei Naegleria fowleri nicht als Eigenschaft dieser Art generell zu betrachten sei, da innerhalb einer Art pathogene und nichtpathogene Stämme gefunden werden. Dies gilt ebenso für Acanthamoeba sp., wie aus Untersuchungen von JONCKHEERE (1980)[31] hervorgeht. Daher ist es notwendig, die einzelnen Stämme genau zu charakterisieren und ihre Eigenschaften zu untersuchen.
Es zeigte sich darüber hinaus, daß auch definierte Naegleria-Stämme eine variable Pathogenität aufweisen können (DEMPE, 1980)[32]. Das veranlaßte zu prüfen, ob Akanthamöben, die im Wasser vorkommen, unter bestimmten Bedingungen pathogen werden können.
Diese Untersuchung führten JANITSCHKE et al. (1983)[56] durch. Sie isolierten dazu aus Berliner Gewässern Akanthamöben-Arten, die bei Mäusen apathogen waren. Durch mehrmalige schnelle Tierpassagen wurden sie pathogen und riefen bei Mäusen Erkrankungen hervor. Es wird daher angenommen, daß Amöben, die durch Staub oder Luft über die Nase auf die Schleimhäute des Menschen gelangen, nach mehrmaliger Passage ebenfalls pathogen werden können. Hierbei könnte eine Selektion von Amöben mit pathogenen Eigenschaften von Bedeutung sein. Haben sich die Protozoen in der Nasenschleimhaut eingenistet, wandern sie in die Lunge, in die Blutgefäße und ins Gehirn; dabei

scheint die Aktivierung von Enzymen eine besondere Rolle zu spielen.

1.5. Immunität des Wirtes gegenüber einer Amöbeninfektion

Es fällt auf, daß nur äußerst wenige Fälle von Erkrankungen auftraten, obwohl eine große Anzahl von Menschen mit Wasser in Berührung kam, in dem man pathogene Amöben nachweisen konnte. Somit erhebt sich die Frage, ob eventuell ein Resistenzmechanismus des Wirtes von Bedeutung ist, d. h. ob beim Menschen eine Abwehrreaktion gegenüber pathogenen Amöben besteht.
Es hat sich gezeigt, daß Erkrankungen mit Naegleria überwiegend bei jüngeren Personen auftraten, d. h. bei Personen unter 30 Jahren. HAGGERTY & JOHN (1978)[50] kamen aufgrund einer Reihe von Experimenten mit Tieren zu folgenden Ergebnissen: außer der Pathogenität der Amöben sind es noch eine Reihe von Faktoren, die die Anfälligkeit für Amöbeninfektionen beeinflussen, nämlich das Alter, das Geschlecht und die Rasse der Tiere. Sie verwendeten bei ihren Experimenten männliche und weibliche DUB/ICR Mäuse verschiedenen Alters, nämlich im Alter von drei Wochen, vier Wochen, sechs Wochen und 24 Wochen und infizierten sie intravenös (i.v.) mit $2{,}5 \times 10^5$ pathogenen Naegleria fowleri pro Gramm Körpergewicht. Es zeigte sich, daß die Mortalitätsrate bei zunehmendem Alter abnahm. Starben von den drei Wochen alten Mäusen noch 100% nach der Infektion, so überlebten von den 24 Wochen alten Mäusen noch 55%.

Bei weiteren Untersuchungen ergab sich, daß bei gleicher Rasse und bei gleich hoher Infektionsdosis mehr männliche als weibliche Mäuse starben (HAGGERTY & JOHN, 1978)[50]. Bei anschließenden Experimenten verwendeten HAGGERTY & JOHN (1978)[50] verschiedene Mäuserassen und stellten hierbei fest, daß die

Mortalitätsrate bei gleicher Behandlung in Abhängigkeit von der Rasse starke Unterschiede aufwies, sie schwankte zwischen 10 und 95%. Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren ihrer Meinung nach darauf zurückzuführen, daß diese Gruppen eine unterschiedliche Immunität gegenüber pathogenen Amöben besaßen. Als Indiz für die Richtigkeit ihrer Annahme könnten die Experimente mit den unterschiedlichen Tierrassen gedeutet werden, da der Mäusestamm, bei dem der Komplement-Faktor "C 5" im Immunsystem fehlte, die höchste Mortalität (95%) aufwies.
Bereits 1970 hatte CARTER[10] bei Untersuchungen festgestellt, daß im menschlichen Blutserum ein Faktor vorhanden ist, der Naegleria fowleri zum Absterben bringt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß diese Amöben fast nur im Gehirn zu finden sind und nicht in anderen Organen, da sie über die Nasenschleimhaut direkt ins Gehirn vordringen können. CURSON et al. führten 1980[26] in Neuseeland Untersuchungen darüber durch, ob im Blut gesunder Menschen Antikörper gegenüber freilebenden pathogenen Amöben nachzuweisen sind. Bei allen untersuchten Personen wurden Antikörper gegen pathogene Amöbenarten gefunden, und zwar mit einem Titerwert von 1:5 bis 1:20 gegen Naegleria und von 1:20 bis 1:80 gegen Akanthamöben. Die Antikörper gehörten hauptsächlich den Immunglobulin-Klassen G und M an. Hinsichtlich der Antikörpertiter gab es keinerlei Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Personen.
Eine Reihe von Experimenten befaßte sich mit der Immunreaktion von Tieren gegenüber Naegleria fowleri. ADAMS et al. (19 fanden bei ihren Experimenten mit Naegleria fowleri heraus daß der wichtigste Faktor bei einer Infektion die Höhe der Infektionsdosis war. Eine Reihe von Forschern (JOHN et al., 1977[58]; THONG et al., 1978, 1979[101,102]) befaßte sich mit der Immunität von Tieren gegenüber Naegleria fowleri. Die Versuchstiere erhielten intravenös (i.v.), intraperitoneal (i.p.) und subkutan eine Gabe von pathogenen Naegleria fowler lebenden oder abgetöteten Naegleria sowie auch apathogenen Naegleria; anschließend wurden alle Tiere mit Dosen

pathogener Naeglerien infiziert, entweder intravenös oder intranasal (i.n.). Es zeigte sich, daß von den mit verschiedenen Formen von Naegleria vorbehandelten Tieren mehr überlebten als von einer Gruppe Kontrolltiere, die ohne eine Vorbehandlung pathogene Naeglerien erhalten hatten.
ADAMS et al. (1976)[1] gaben einer Gruppe von Mäusen 24 Stunden, bevor sie sie mit pathogenen Naeglerien infizierten, aus Escherichia coli gewonnene Lipopolysaccharide. Es zeigte sich, daß dadurch eine gewisse Schutzwirkung erzielt wurde, die mehrere Tage anhielt. DIFFLEY et al. (1976)[34] führten mit Naegleria fowleri Untersuchungen an Meerschweinchen durch. Aufgrund ihrer Ergebnisse stellten sie die Vermutung auf, daß bei den überlebenden Meerschweinchen spezifische und/oder unspezifische Immunfaktoren die Amöben zerstörten, ehe letztere den Tod der Meerschweinchen bewirken konnten. FERRANTE und THONG (1979)[39] beobachteten, daß Naegleria fowleri anscheinend die Fähigkeit besitzt, Antikörper von seiner Oberfläche zu entfernen und dadurch das Immunsystem des Wirtes zu inaktivieren.

Über die Immunreaktionen gegen eine Infektion durch Akanthamöben liegen bisher wenige Erkenntnisse vor. CULBERTSON (1971)[25] hatte nach einer i.p.-Infektion von Mäusen mit Akanthamöben und anschließender Gabe der gleichen pathogenen Amöben intranasal eine Schutzwirkung beobachten können. War die vorhergehende Infektion hingegen mit apathogenen Akanthamöben vorgenommen worden, dann konnte CULBERTSON eine geringere Schutzwirkung feststellen (10 - 20%).
ROWAN-KELLY et al. (1984)[85] erzielten auch nach einer i.p.-Gabe abgetöteter Akanthamöben oder Kulturüberstand eine gute Schutzwirkung (bis 80%) gegen eine anschließende i.n.-Infektion (Challenge) von A-1 bei Mäusen.
Während man Erkrankungen durch Naegleria-Amöben in der Regel bei vorher gesunden Menschen beobachtet, finden sich Infektionen durch Akanthamöben überwiegend bei Personen mit angegriffenem Gesundheitszustand, wie Alkoholikern, Diabetikern oder Personen, die immunsuppressiv behandelt werden

(MARTINEZ, 1980)[71]. MARKOWITZ et al. (1978)[67] bemerkten bei ihren Untersuchungen, daß nach einer Infektion mit Akanthamöben mehr Tiere starben, wenn sie zuvor mit Methylprednisolon oder Tetrazyklin behandelt worden waren. Die Mortalitätsrate betrug 50% bzw. 60% nach Behandlung gegenüber 10% bei Kontrolltieren.

1.6. Fragestellung

Da in der Umwelt Akanthamöben weit verbreitet sind und die bisherigen Forschungsergebnisse gezeigt haben, daß Infektionen bei körperlich geschwächten Personen häufiger auftreten, kann man vermuten, daß Immunreaktionen bei der Infektabwehr von Bedeutung sind.
Es stellt sich die Frage: Führen die überall in der Umwelt vorkommenden freilebenden Akanthamöben im Wirt zu einer Abwehr gegenüber pathogenen Stämmen? Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit dem Wirt und seiner möglichen Immunisierung. Am Modell der Maus sollte geprüft werden, ob eine aktive Immunisierung mit pathogenen und apathogenen Akanthamöben oder anderen Mikroorganismen durchführbar ist und inwieweit eine mögliche Immunreaktion gesteigert oder vermindert werden könnte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Überblick

Die Untersuchungen gingen nach folgendem Konzept vor sich: die Mäuse wurden zuerst mit Antigenen aus verschiedenen Amöbenarten bzw. -stämmen sowie verschiedenen Erregern und Immunstimulantien behandelt. Nach einer vorgegebenen Zeit wurden sie mit einem für Mäuse hochvirulenten Akanthamöbenstamm intranasal infiziert. In den nachfolgenden Tagen beobachtete ich, ob die Tiere starben. Der Nachweis der Amöbeninfektion erfolgte mittels kultureller und histologischer Methoden.
Bei einem anderen Untersuchungsgang erhielten die Tiere zuerst Antigene, anschließend führte ich eine Behandlung mit immunsuppressiven Mitteln durch, danach erfolgte ebenfalls eine intranasale Infektion mit einem pathogenen Akanthamöbenstamm. Auch hier wurde in den nachfolgenden Tagen auf Letalität beobachtet.

Folgende Stämme fanden bei den Experimenten Verwendung:

1. Acanthamoeba culbertsoni A-1; isoliert aus ZNS
2. Acanthamoeba lugdunensis SH-565; isoliert aus Stuhl
3. Acanthamoeba castellanii X-133; Laborstamm (Heidelberg)
4. Acanthamoeba sp. WB; isoliert aus Wasser (Berlin)
5. Acanthamoeba sp. SA; isoliert aus Schlamm (Berlin)

Die Stämme A-1 und SH-565 wurden mir von Dr. J.F. DeJONCKHEERE aus Belgien und der Stamm X-133 von Dr. H. JANZEEN aus Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die von Dr. K. JANITSCHKE aus Berliner Gewässern isolierten (JANITSCHKE et al., 1982)[55] im Robert-Koch-Institut angezüchteten Stämme wurden mir für die Experimente überlassen.

Wie die Vorversuche zur Pathogenitätsprüfung ergaben, handelte es sich bei A. culbertsoni A-1 um einen virulenten Stamm, d. h. nach i.n.-Gabe an Mäuse starb die Hälfte der

Tiere. Die anderen Amöbenstämme riefen mit Ausnahme von A. lugdunensis SH-565 keine Erkrankungen bei Mäusen hervor. A. lugdunensis war als schwach virulenter Stamm anzusehen, da bei den Vorversuchen nach der Infektion mit diesem Stamm nur zwei von 15 Mäusen starben.

2.2. Kulturverfahren

Den gesamten Zeitraum der Untersuchungen hindurch wurden die Amöbenstämme axenisch in flüssigem Chang-Jonckheere-Medium (CHANG, 1974)[17] gehalten und gezüchtet.

Für das Medium fand folgendes Rezept Anwendung:

In 900 ml aqua dest. wurden gelöst

- Isoelektrisches Kasein	(Merck 2239)	10,0 g
- Na_2HPO_4	(Merck 6585)	1,325 g
- Glukose	(Merck 8342)	2,5 g
- KH_2PO_4	(Merck 4871)	0,8 g
- Hefeextrakt (Difco 0127-01)		5,0 g

Das Gemisch wurde in Flaschen abgefüllt und autoklaviert. Die Amöbenkulturen wurden in bestimmten Abständen in diesem Medium passagiert. Um eine Kontamination zu vermeiden, fand der gesamte Impfvorgang unter Lamina-Air-Flow statt. Je 9 ml sterile Chang-Jonckheere-Lösung wurden in eine Gewebekulturflasche (Falcon) gefüllt. Hinzu kam 1 ml steriles Kälberserum. Wie bekannt, haften viele Trophozoiten der Amöben fest an der Gefäßwand. Um eine homogene Suspension für eine Passage zu erhalten, mußte deshalb die bewachsene Kulturflasche kurz geschüttelt werden, um die Trophozoiten von der Gefäßwand zu lösen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette konnten dann zwei Tropfen dieser Suspension in frische Lösung überführt werden. Die neuen Flaschen kamen in den Brutschrank, je nach

Amöbenart bzw. -stamm wurde die jeweils günstigste Temperatur gewählt, für A. culbertsoni A-1 sowie A. sp. WB und A. sp. SA 37° C, für A. castellani waren 29° C am besten geeignet, für A. lugdunensis SH-565 35° C.
Antibiotika wurden dem Medium nicht zugesetzt.
Die Beobachtung des Amöbenwachstums erfolgte durch ein Spezialmikroskop (Invertoskop - Zeiss).

2.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche NMRI-Mäuse, die zu Beginn eines jeden Versuchsganges drei Wochen alt waren und ca. 15 g wogen. Die Tiere lieferte die Zentrale Versuchsanstalt (ZVZ) in Berlin jeweils vier Tage vor Beginn eines neuen Versuchsganges. Während der vier Tage sollten sie sich an die neue Umgebung gewöhnen. Die Tiere wurden unter folgenden Bedingungen gehalten: Raumtemperatur 22° C, relative Luftfeuchtigkeit 40 - 50%, 20 facher Luftwechsel pro Stunde, Beleuchtung über 12 Stunden bei 3000 Lux.
Die Tiere kamen zu je 15 Tieren in Makrolon-Käfige, als Einstreu diente Herilan Weichholzgranulat, das Futtermittel war Herilan Standard pellets. Außerdem erhielten sie Leitungswasser. Der Tierraum war von den übrigen Laborräumen abgetrennt, die Käfige wurden in regelmäßigen Abständen gesäubert und desinfiziert.

2.4. Plattentest

Zum Nachweis der Amöben in den Organen der Versuchstiere diente in erster Linie der Plattentest. Die Durchführung

dieses Tests erfolgte folgendermaßen:

I. Herstellung einer Page-Lösung (PAGE, 1976)[80]

Diese Lösung besteht aus:

1.	NaCl	(Merck 6400)	1,20 g
2.	$MgSO_4.7\ H_2O$	(Merck 5882)	0,04 g
3.	$CaCl_2.2\ H_2O$	(Merck 2381)	0,04 g
4.	Na_2HPO_4	(Merck 6585)	1,42 g
5.	KH_2PO_4	(Merck 4871)	1,36 g

Jedes Salz wurde für sich in 100 ml aqua dest. gelöst (Stammlösung 1 - 5) und autoklaviert. Von jeder wurden 10 ml mit 1 l aqua dest. gemischt und erneut autoklaviert.

II. Fertigstellung der Wasser-Agar-Kulturplatten

Zu der Page-Lösung wurde 1,5% Agar hinzugefügt und diese Mischung auf eine Platte gegossen. Diese sogenannten "Wasser-Agar"-Kulturplatten wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

III. Vorbereitung zum Amöbennachweis

Zur Vorbereitung des Amöbennachweises trug ich auf die Kulturplatten zwei Tropfen einer E. coli-Bakteriensuspension (E. coli Stamm Genf B) auf und verteilte sie mit einem Glasstab gleichmäßig. Nach dem Trocknen der Suspension konnte mit einem sterilen Skalpell in der Mitte ein Streifen herausgeschnitten werden, so daß auf der Platte zwei getrennte Bereiche entstanden (s. Abb. 1).

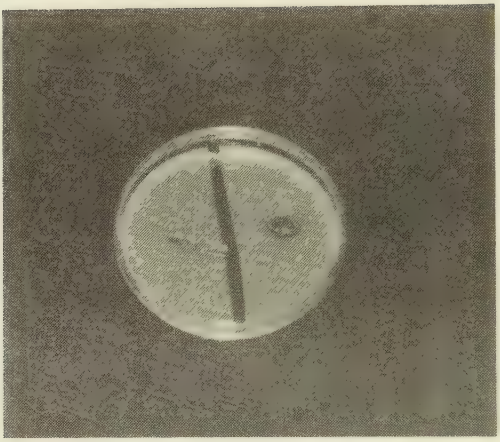


Abb. 1: Plattentest

Einer nach einer Amöbeninfektion gestorbenen Maus wurden unter sterilen Bedingungen das Gehirn und die Lunge entnommen. Je ein Teil dieser beiden Organe kam auf je eine Seite einer Kulturplatte. Diese wurde schließlich im Brutschrank bei 37° C bebrütet. Nach mehreren Tagen erfolgte unter dem Mikroskop die Oberprüfung, ob auf der Platte ein Amöbenbefall nachzuweisen war.
Der andere Teil des Gehirns bzw. der Lunge wurde für eine spätere histologische Untersuchung in einer Plastikflasche in 10%igem Formalin aufbewahrt.

2.5. Histologische Untersuchung

Fixierte Gewebepräparate mußten in Paraffin eingebettet werden. Zuvor ging deshalb die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei 56° C im Brutschrank nach folgendem Schema vor sich:

1. 70 % Propanol für 1 1/2 Stunden
2. 90 % Propanol für 1 1/2 Stunden
3. 90 % Propanol für 1 1/2 Stunden
4. 99 % Propanol für 1 1/2 Stunden
5. 99 % Propanol für 1 1/2 Stunden.

Danach kamen die Präparate in einer zu gleichen Teilen aus 99%igem Alkohol und Paraplast bestehenden Lösung wiederum bei 56° C in den Brutschrank. Nachdem sie über Nacht in reinem Paraplast gelegen hatten, wurde das Gewebe am nächsten Tag in reines Paraffin überführt und durch Abkühlung ein fester Block hergestellt. Mit einem Mikrotom wurden aus dem Block 7 µm dicke Schnittpräparate hergestellt. Darauf folgten die Streckung der Paraffinschnitte in einem 60° warmen Wasserbad, die Auftragung auf einen Objektträger und schließlich die Trocknung im Brutschrank über einen Tag.

Hämatoxilin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Obwohl bei pathologischen Untersuchungen zum Nachweis für einen Befall mit freilebenden Amöben häufig die H.E.-Färbung angewendet wird, wurde versucht, außer der H.E.-Färbung auch die Azan-Färbung anzuwenden. Es zeigte sich jedoch, daß die H.E.-Färbung am geeignetsten war.

H.E.-Färbung

Vor der Färbung mußten die Schnitte in einer Xylol-Lösung deparaffiniert werden und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe wieder gewässert werden. Dies erfolgte nach folgendem Schema:

1. 5 min Xylol
2. 5 min Xylol
3. 2 min Propanol abs.
4. 2 min Propanol 95 %
5. 2 min Propanol 90 %
6. 2 min Propanol 80 %

7. 2 min Propanol 70 %
8. 2 min aqua dest.
9. 5 min Haematoxylin
10. kurz unter 1 % HCl (Differenzierung)
11. 10 min Leitungswasser
12. 20 min Eosin
13. 1 min aqua dest.

Zur Einbettung in eine Cedac-Lösung mußte das Schnittpräparat anschließend wiederum eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen. Dann kam das Präparat in ein Xylol-Bad. Danach wurde auf das Präparat ein Tropfen Cedac gegeben und ein Deckglas aufgelegt.

2.6. Durchführung der Immunisierungsversuche

2.6.1. Anzucht eines virulenten Amöbenstammes

Vor den eigentlichen Versuchen zur Immunisierung war es notwendig, einen hochvirulenten Akanthamöben-Stamm auszuwählen und anzuzüchten. Zur Verfügung stand der Stamm A. culbertsoni A-1, der als pathogen u. a. für Mäuse gilt. Da die Amöben jedoch über längere Zeit hindurch in einer axenischen Kultur kultiviert worden waren, war der Stamm weitgehend apathogen geworden. Eine Steigerung der Virulenz konnte dadurch erreicht werden, daß der Stamm wiederholt den Versuchstieren intracranial injiziert wurde. Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen:
Nach kräftigem Schütteln der Falconflaschen mit vier Tage alten A. culbertsoni A-1 Kulturen - ein Zeitpunkt, zu dem sich die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden - wurden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und anschließend zentrifugiert (1 000 U/min - 10 Minuten).

War der Oberstand abgesaugt, konnten die im Bodensatz konzentrierten Amöben mit einer Pagelösung vermischt werden (Waschvorgang). Diese Mischung wurde wiederum 10 Minuten (1 000 U/min) lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Bodensatz noch einmal mit Pagelösung gewaschen. Noch einmal wurde zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, der gesamte Bodensatz in ein Röhrchen umgefüllt und anschließend in der Zählkammer die im Bodensatz enthaltenen Amöben ausgezählt. Nach der Zählung mußte er mit einer Pagelösung so weit verdünnt werden, daß pro 0,1 ml Suspension 10 000 Trophozoiten enthalten waren.
Diese Amöbensuspension wurde zur Tierpassage benutzt. Dazu erhielten 10 Mäuse eine kurze Betäubung mit Penthrane (Methoxyfluran, 2.2 Dichlor 1.1 difluräthyl-methyläther mit 0,01 % g/g Brutylhydroxytoluol), anschließend mit einer Spritze eine intracraniale Injektion von 0,1 ml der Amöbenlösung, d. h. je Maus wurden etwa 10 000 Trophozoiten eingespritzt.
Mehrere Tage nach Auftreten der Erkrankung erfolgte die Tötung der Mäuse und die Entnahme der Gehirne unter sterilen Bedingungen. Diese kamen sofort in Chang-Jonckheere-Medium, das 10 % Kalbsserum enthielt, jedoch keinerlei Zusatz von Antibiotika. Die Kulturflaschen mit den Gehirnen wurden im Brutschrank bei 37° C bebrütet. Sobald ein Wachstum der Amöben beobachtet werden konnte, kamen diese in neue Flaschen zur Züchtung von Subkulturen.
Von diesen Kulturen gewann ich auf die gleiche Art wie zuvor eine Amöbensuspension, die zu einer weiteren Gehirnpassage diente. Dieses Verfahren wurde noch einige Male wiederholt. Mit den so gewonnenen Amöben erfolgte eine intranasale Infektion von 10 Mäusen, die je 30 g wogen; die Tiere erhielten nach kurzer Betäubung und in Rückenlage mit einer Eppendorf-Pipette je Maus ca. 50 000 Trophozoiten in 25 µl intranasal übertragen.
Die Letalitätsbeobachtung ergab, daß alle 10 Mäuse starben. Die Wiederholung des Versuches brachte das gleiche Ergebnis, innerhalb von 10 Tagen starben alle 10 Mäuse. Gehirne

und Lungen wurden auf Amöbenbefall untersucht (Plattentest), in den Gehirnen konnten A-1 nachgewiesen werden. Das rechtfertigte die Vermutung, daß es gelungen war, einen hochvirulenten Amöbenstamm zu züchten.

2.6.2. Immunisierung mit definierten, weitgehend apathogenen Amöbenarten und -stämmen und Belastung mit einem lebenden, für Mäuse pathogenen Stamm

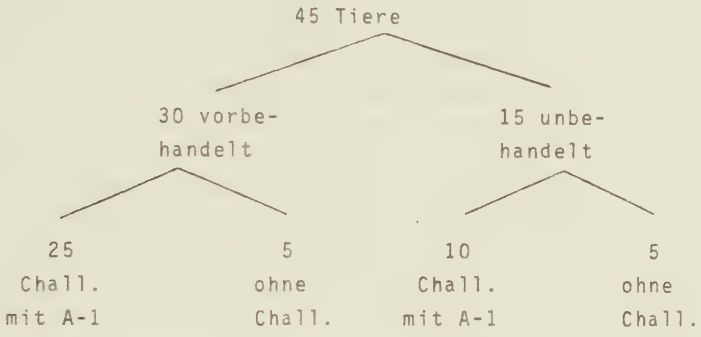
Der erste Versuch zur Immunisierung von Mäusen erfolgte mit Acanthamoeba sp. SA. Dazu mußte eine große Anzahl von Amöben gezüchtet werden. Die vier Tage alten Kulturen wurden dann zentrifugiert, gewaschen, der gesamte Bodensatz in Röhrchen umgefüllt, gezählt und mit Page-Lösung vermischt, damit je 25 ul ca. 50 000 Trophozoiten enthielten.
Eine Versuchsgruppe bestand aus 45 Mäusen. Von diesen erhielten 30, während einer kurzen Betäubung mit Penthrane und in Rückenlage liegend, mittels einer Eppendorf-Pipette eine Gabe von 25 µl (50 000) Trophozoiten. 15 von ihnen blieben unbehandelt und von den anderen getrennt.
19 Tage nach der Vorbehandlung erhielten 25 der behandelten und 10 der unbehandelten Mäuse eine intranasale Infektion von je 50 000 pathogenen A. culbertsoni A-1 (s. Schema).

Die folgenden 30 Tage dienten der Letalitätsbeobachtung; die toten Mäuse wurden präpariert, ihre Gehirne und Lungen dem Plattentest unterzogen und in Formalin aufbewahrt.
Die überlebenden Mäuse tötete ich nach 30 Tagen ebenfalls; ihre Gehirne und Lungen wurden mit dem Plattentest untersucht und auch in Formalin aufbewahrt.

In gleicher Weise verliefen Versuchsreihen mit den apathogenen Stämmen A. lugdunensis SH-565, A. sp. WB und A. castellanii X-133. A. lugdunensis SH-565 wies bei der

Pathogenitätsprüfung im Vorversuch eine leichte Pathogenität auf. Es gelang jedoch, durch Klonierung und Weiterzüchtung den Stamm apathogen zu machen.

Schema:



Chall. = Challenge (Infektion)

2.6.3. Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Antigenen aus definierten apathogenen und pathogenen Amöbenstämmen und Belastung mit einem lebenden, pathogenen Stamm

Der erste Schritt dieser Versuchsreihe war die Züchtung von Acanthamoeba culbertsoni A-1 in großer Zahl. Die vier Tage alten Kulturen wurden, wie schon zuvor beschrieben, in Zentrifugenröhrchen umgefüllt, zentrifugiert, der Oberstand wurde abgesaugt, der Bodensatz zweimal mit Page-Lösung gewaschen. Nach Umfüllung des Bodensatzes aller Zentrifugenröhrchen mit einer sterilen Pipette in ein Röhrchen zählte ich die Trophozoiten mittels einer Zählkammer. Es folgte die Verdünnung des Bodensatzes mit der sterilen Page-Lösung, damit eine

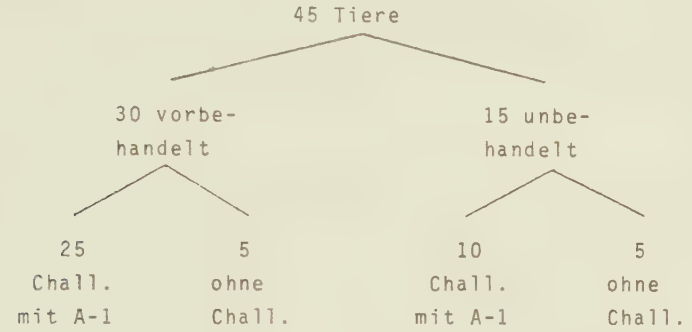
Konzentration von ca. 50 000 Trophozoiten pro 25 µl entstand.

Um aus diesen Amöben nichtvermehrungsfähige Antigene herzustellen, kam die Amöbensuspension anschließend für zwei Stunden bei -80° C in einen Tiefkühlschrank. Nach zwei Stunden wurde das Röhrchen in lauwarmem Wasser aufgetaut, dann kam die Suspension noch einmal für eine Stunde bei -80° C in den Tiefkühlschrank und wurde wiederum aufgetaut. Nun gab ich einen Tropfen der Amöbensuspension aus dem Röhrchen auf eine Coli-Agar-Platte, die in den Brutschrank kam. Auf diese Weise sollte mit Sicherheit festgestellt werden, daß die Amöben nicht mehr vermehrungsfähig waren. Wenn in dem nährstoffhaltigen Medium der Coli-Agar-Platte kein Amöbenwachstum stattfand, konnte man davon ausgehen, daß die Amöben nach dem Abtötungsprozeß tatsächlich nicht mehr vermehrungsfähig waren. Das Röhrchen wurde anschließend in einem Tiefkühlschrank bei -20° C aufbewahrt.

Von einer Versuchsgruppe von 45 Mäusen blieben 15 unbehandelt und wurden getrennt gehalten. 30 Mäuse erhielten eine intranasale Gabe der nichtvermehrungsfähigen A. culbertsoni A-1; die Mäuse wurden hierzu kurz betäubt und erhielten, in Rückenlage liegend, mit einer sterilen Eppendorf-Pipette jeweils 25 µl (ca. 50 000) Amöben intranasal verabreicht. Dieser Vorgang wurde noch dreimal in viertägigem Abstand wiederholt.
Sieben Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte die intranasale Inokulation (Challenge) mit pathogenen Acanthamoeba culbertsoni A-1, und zwar bei 25 der 30 immunisierten Mäuse und 10 der nichtimmunisierten Mäuse (s. Schema). Die Infektion erfolgte ebenfalls durch 25 µl Amöbensuspension je Maus, etwa 50 000 Trophozoiten wurden appliziert. In den folgenden Tagen wurde die Letalität beobachtet. Die Gehirne und Lungen der toten Mäuse wurden herauspräpariert, je eine Hälfte dieser Organe diente dem Plattentest, die andere Hälfte kam in 10%iges Formalin. Die überlebenden Mäuse nach dem Challenge mußten nach 30 Tagen ebenfalls getötet

und ihre Gehirne und Lungen dem vorgenannten Test unterzogen werden. Anschließend folgten auf gleiche Weise Versuche zur Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Antigenen aus A. lugdunensis SH-565, A. sp. SA, A. sp. WB und A. castellanii X-133.

Schema:



Chall. = Challenge (Infektion)

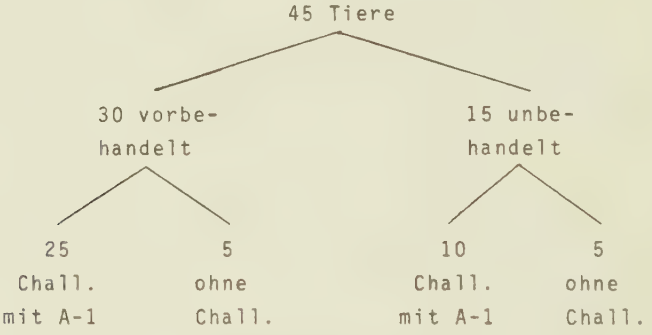
2.6.4. Immunisierung mit Oberständen aus Amöbenkulturen

Eine sieben Tage alte Kultur von A. sp. SA wurde in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und zentrifugiert (1 000 U/min - 10 Minuten). Der abgesaugte Kulturüberstand kam in einen sterilen Behälter. Zur Vermeidung jeder möglichen Kontamination mit anderen Mikroorganismen filtrierte ich den Oberstand durch einen Mikrofilter (Sartorius SM 165 27, Porengröße -0,2 µm) und füllte ihn in einen sterilen Behälter. Zur Oberprüfung, daß keine Amöben oder Bakterien in der Flüssigkeit enthalten waren, gab ich je zwei Tropfen auf eine Agarplatte und eine Coli-Agar-Platte und stellte diese anschließend in den Brutschrank (37° C).

Der restliche Kulturüberstand lagerte bei -20°C im Kühlschrank. Für den Versuch wurde der Kulturüberstand aus dem Kühlschrank genommen und aufgetaut.

30 Mäuse der aus 45 Mäusen bestehenden Versuchsgruppe erhielten, nach vorhergehender kurzer Betäubung mit Penthrane, je Maus 25 µl Kulturüberstand intranasal eingeführt (s. Schema). Die Kontrollgruppe aus 15 Mäusen erhielt intranasal 25 µl reines Medium (Chang-Jonckheere-Medium). Dieser Vorgang wurde im Abstand von jeweils vier Tagen noch dreimal wiederholt.

Schema:



Chall. = Challenge (Infektion)

Sieben Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die intranasale Infektion mit pathogenen Acanthamoeba A-1, und zwar bei 25 Tieren der mit Kulturüberstand behandelten Gruppe und 10 Tieren der mit reinem Medium behandelten Mäuse. Der intranasale Challenge erfolgte, wie bei den anderen Versuchen, mit 25 µl (ca. 50 000 Trophozoiten) pathogenen A. culbertsoni A-1 je Maus.
Nach 30 Tagen, während derer die Letalität wiederum beob-

achtet wurde, erfolgte die Präparierung der den toten Mäusen entnommenen Organe, Gehirn und Lunge, sowie deren Auswertung durch Plattentest.

Auf die gleiche Weise erfolgte ein Versuch, bei dem die Immunisierung mit Kulturüberständen von Acanthamoeba culbertsoni A-1 vorgenommen wurde.

2.6.5. Beeinflussung der Immunreaktion durch verschiedene Erreger

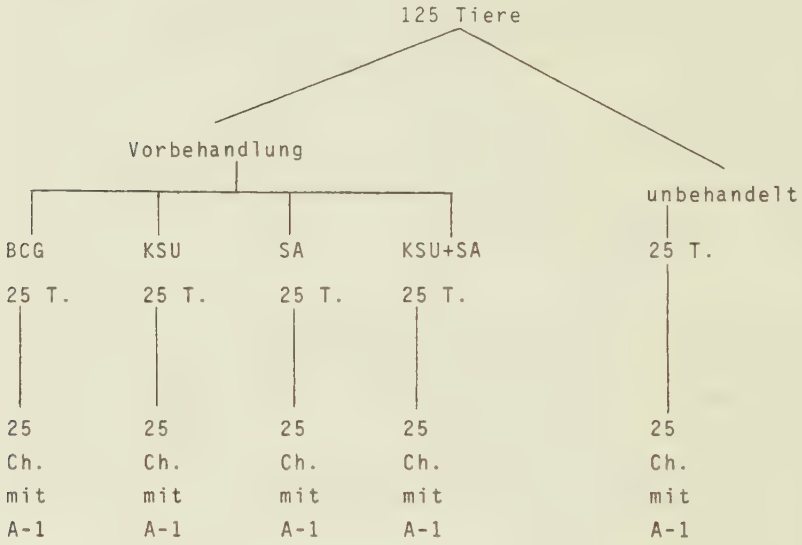
Für diesen Versuch standen fünf Gruppen von je 25 Mäusen zur Verfügung. Eine Gruppe blieb unbehandelt. Die anderen vier Gruppen wurden mit verschiedenen Erregern behandelt, mit Toxoplasma gondii Stamm KSU (avirulent), mit Bacillus Calmette Guerin (BCG) Stamm Cannaught, mit Acanthamoeba sp. SA sowie Toxoplasma gondii KSU + Acanthamoeba sp. SA (s. Schema).

Um Toxoplasma-Zysten zu erhalten, tötete ich latent mit Toxoplasma infizierte Mäuse, präparierte deren Gehirne heraus und stellte eine Gehirnsuspension her, indem ich pro Gehirn 1 ml physiologische Kochsalzlösung hinzufügte. Die Zahl der Zysten wurde festgestellt und die Suspension verdünnt.
Die Infektion erfolgte durch eine orale Gabe von 0,3 ml Gehirnsuspension pro Maus, die somit jeweils etwa 10 Zysten Toxoplasma gondii Stamm KSU erhielten.

Die zweite Gruppe bekam intravenös BCG. Eine Ampulle mit lebenden Keimen BCG-Cannaught (Lot Nr. 368-1) wurde im Verhältnis 0,05 ml in 4,95 ml NaCl = 1 : 100 verdünnt. Nach kurzer Erwärmung der 25 Mäuse der Versuchsgruppe unter einer Infrarotlampe, damit ihre Schwanzvene deutlich hervortrat,

erhielt jede Maus mit einer sterilen Spritze je 0,2 ml dieser BCG-Keime injiziert (ca. 16 000 Keime pro Maus).

Schema:



T. = Tiere
Ch. = Challenge

Für die dritte Gruppe fand eine vier Tage alte Kultur von Acanthamoeba sp. SA Verwendung. Die übliche Vorbehandlung, wie sie in Kapitel 2.6.2. beschrieben ist, erbrachte eine Amöbensuspension, die in 25 µl etwa 50 000 lebende Trophozoiten enthielt. Mit diesen Keimen wurde die dritte Gruppe von 25 Mäusen mit ca. je 50 000 Trophozoiten intranasal infiziert.

Die vierte Versuchsgruppe von 25 Mäusen erhielt einmal oral eine Infektion von 10 Toxoplasma-Zysten, zusätzlich eine Infektion mit je 50 000 Trophozoiten von Acanthamoeba sp. SA pro Maus.
Nach 30 Tagen wurden alle Tiere, auch die 25 Mäuse der zuvor unbehandelten Gruppe, mit einem pathogenen Amöbenstamm, mit A. culbertsoni A-1, intranasal infiziert. Auch hier erhielt jede Maus 25 µl bzw. ca. 50 000 Trophozoiten.

In den folgenden Tagen wurde die Letalität beobachtet und der Amöbenbefall kontrolliert.

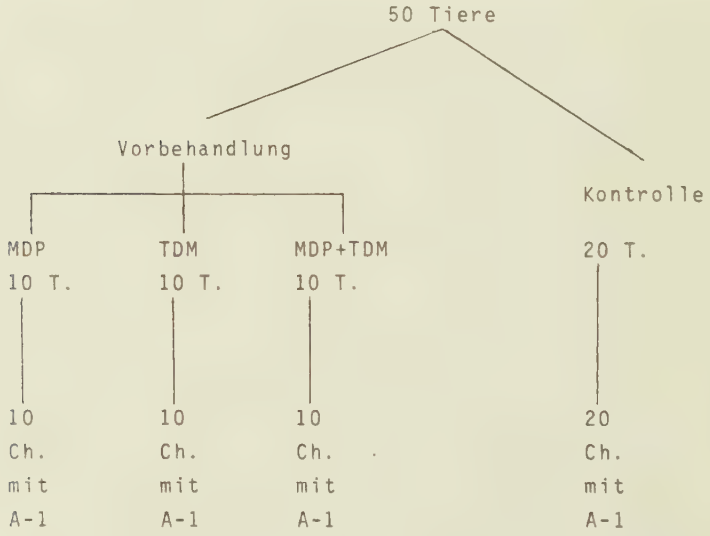
2.6.6. Immunisierung mit Bakterienzellwandantigen, mit Muramyldipeptid (MDP) und Trehalosedemycolat (TDM)

MDP (Muramyldipeptid) und TDM (Trehalosedemycolat) sind Zellwandkomponenten der Mycobakterien, die als Immunstimulantien Verwendung finden.
Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde zunächst das in Pulverform vorliegende TDM bzw. MDP gewogen. Das abgewogene TDM wurde mit Squalane (Haifischöl) vermischt; dann kam Tween-Puffer-Lösung (0,01 % Tween) hinzu. Es entstand so eine TDM-Öl-Wasser-Emulsion, die 2 % Squalane enthielt. Auf die gleiche Weise stellte ich eine Öl-Wasser-Emulsion mit MDP her, als dritte Emulsion eine Kombination der TDM- und der MDP-Emulsion. Dies ging folgendermaßen vor sich:
TDM wurde in CM (Chloroform-Methanol reinst.) im Verhältnis 85 : 15 gelöst und gut mit MDP gemischt. Unter N_2-Zufuhr mußte die Mischung trocknen, über Nacht wurde sie im Exsikkator mit P_2O_5 (Phosphorpentoxyd) nachgetrocknet. Im Wasserbad wurde das Röhrchen angewärmt, dann 2%ige Squalane hinzugegeben und das Ganze kräftig umgerührt. Schließlich wurde tropfenweise angewärmtes Tween-NaCl hinzugefügt. So entstand zunächst eine Paste, später eine milchig-trübe Emulsion.

Die Versuchsgruppe umfaßte in diesem Fall 50 Mäuse. Von diesen erhielten 10 Mäuse je 150 µg der MDP enthaltenden Emulsion intravenös eingespritzt, weitere 10 je 75 µg der Emulsion mit TDM, 10 Mäuse erhielten die kombinierte Emulsion, die pro Maus 150 µg MDP und 75 µg TDM enthielt. Eine Kontrollgruppe aus 20 Mäusen erhielt 2%ige Squalane. Allen Tieren wurden einmalig die Mittel intravenös gespritzt.

Nach 19 Tagen wurden alle Tiere mit pathogenen A. culbertsoni A-1 intranasal infiziert. Auch in diesem Versuch erhielt jede Maus ca. 50 000 Amöben (s. Schema).

Schema:



T. = Tiere
Ch. = Challenge

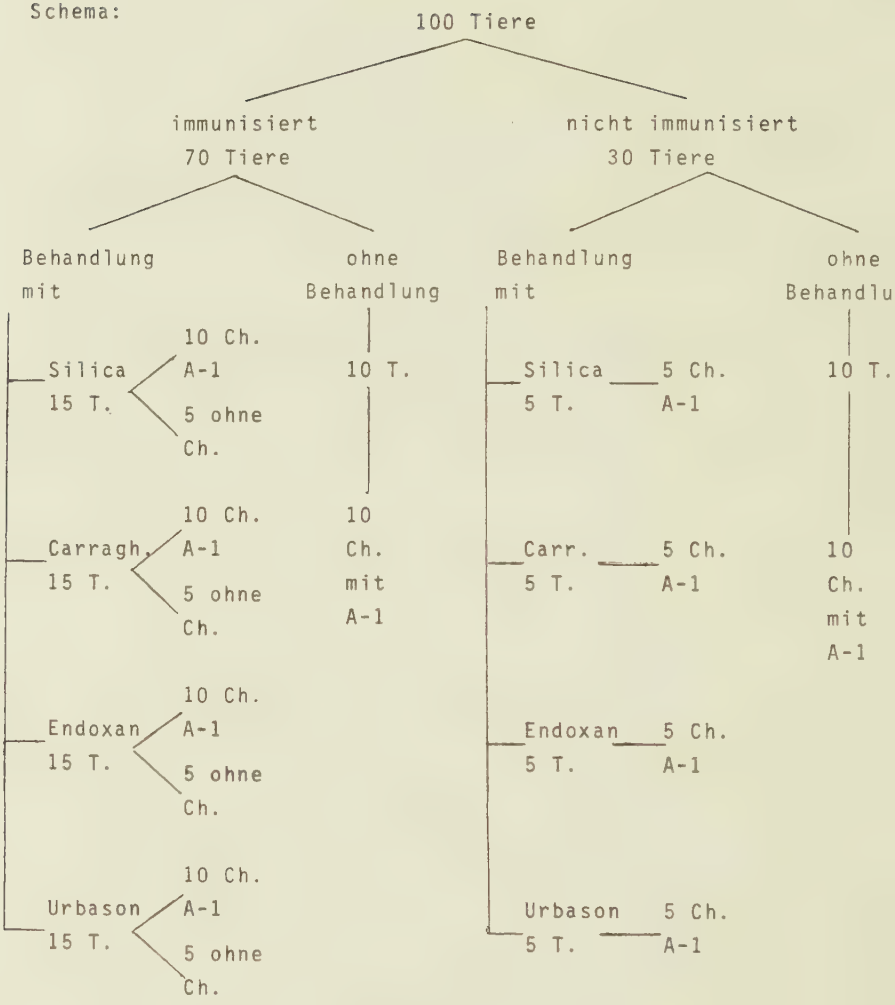
2.6.7. Beeinflussung der Immunreaktion durch Immunsuppressiva

Als Immunsuppressiva dienten folgende Mittel:
Endoxan (Cyclophosphamid, Asta), Urbason (Methylprednisolon, Hoechst), Carragheenan (Sigma) und Silica (Dörentrup).
Für diesen Versuch wurden sechs Gruppen von Mäusen gebildet.
In den Gruppen eins bis vier bestanden die Gruppen aus je 20 Mäusen, von diesen erhielten 15 Mäuse zur Immunisierung viermal intranasal nichtvermehrungsfähiges Antigen aus A. culbertsoni A-1. Jeweils fünf Tiere wurden nicht immunisiert, diese Tiere kamen jeweils in gesonderte Käfige, wie auch je fünf der immunisierten Gruppen eins bis vier.

Gruppe fünf, die aus 10 Tieren bestand, wurde ebenfalls immunisiert, Gruppe sechs, ebenfalls 10 Tiere, blieb ohne jede Behandlung.

Einige Tage nach der letzten Immunisierung erhielten die Gruppen eins bis vier verschiedene Immunsuppressiva. In der ersten Gruppe wurde allen 20 Mäusen, also auch den nichtimmunisierten, an drei Tagen hintereinander pro Maus 0,2 ml (2 mg) Endoxan (Cyclophosphamid) i.p. injiziert.
In Gruppe zwei wurde ebenfalls allen 20 Tieren an drei Tagen hintereinander i.p. 0,2 ml (0,2 mg) Urbason (Methylprednisolon) verabreicht. Die 20 Tiere der Gruppe drei erhielten Silica: kristallines Silica Nr. 12 wurde in Phosphatpuffer (pH 7,2) aufgelöst, der 10 % fetales Kälberserum enthielt. Unmittelbar vor der Anwendung wurde die Silica-Suspension mit Ultraschall (5 s, 80 Sek.) gut gemischt. Jede Maus erhielt dann eine Injektion von 0,3 ml Silica i.p. gespritzt; dies wurde nur einmal wiederholt, um eine zu hohe Belastung der Tiere zu vermeiden. Dabei wurde jeder Maus pro Injektion 7,5 mg Silica gegeben.

Schema:



T. = Tiere
Ch. = Challenge

Carragheenan wurde abgewogen und mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt, kam 25 Sekunden lang unter Ultraschall. Die Mäuse der Gruppe vier erhielten jeweils eine einmalige Injektion i.p. von 0,3 ml pro Maus einen Tag vor der intranasalen Infektion mit A. culbertsoni A-1. Jede Maus erhielt dabei 3 mg Carragheenan.
Die Mäuse der Gruppe fünf erhielten eine dreimalige i.p.-Injektion von physiologischer Kochsalzlösung.

Einen Tag nach der letzten Behandlung mit Immunsuppressiva erhielten die Mäuse der Gruppen eins bis sechs eine Infektion durch A. culbertsoni A-1, außer den jeweils fünf Mäusen der Gruppen eins bis vier, die immunisiert waren und mit Immunsuppressiva behandelt wurden.
Die Infektion erfolgte mit der Standardgabe von etwa 50 000 Trophozoiten pro Maus.

30 Tage lang wurde wiederum die Letalität beobachtet und der Amöbenbefall festgestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Immunisierung mit definierten, weitgehend apathogenen Amöbenstämmen und Belastung mit einem lebenden pathogenen Stamm

Die Tabelle 1 zeigt die unterschiedlichen Versuchsgruppen und die jeweilige Immunisierungsart und gibt an, wieviele Mäuse in den auf die Behandlung mit pathogenen Amöben (A-1) folgenden 30 Tagen überlebten. Außerdem ist für jede Versuchsgruppe die Gesamtzahl der überlebenden Tiere in absoluten Zahlen und prozentual dargestellt.

Es war zu beobachten, daß die unbehandelten Kontrolltiere ohne Ausnahme zwischen dem 5. und 11. Tag nach der Infektion mit pathogenen A-1 starben. Von den behandelten Tieren überlebten jeweils einige den Challenge mit A-1, doch traten Unterschiede in der Oberlebensrate auf.
Die höchste Oberlebensrate zeigte sich bei den Tieren, die mit A. lugdunensis immunisiert worden waren, hier überlebten von 25 Tieren 12, d. h. 48 %.
Von den mit A. sp. SA immunisierten 25 Tieren überlebten 9, d. h. 36 %; von den mit A. sp. WB immunisierten 25 Tieren überlebten 8, d. h. 32 %.
Bei den mit A. castellanii immunisierten Tieren war die niedrigste Oberlebensrate zu beobachten, da von den 25 Tieren nur 6, d. h. 24 % überlebten.
Bei der mit A. lugdunensis behandelten Gruppe ist außerdem zu beachten, daß alle von den unbehandelten Kontrolltieren bis zum neunten Tag starben, während von den immunisierten Mäusen noch 20 am Leben waren, d. h. 80 %.
Ein ähnliches Phänomen, wenn auch mit einer etwas niedrigeren Überlebensrate, ist bei der mit SA behandelten Gruppe zu beobachten. Am 10. Tag waren hier ebenfalls alle Kontrolltiere gestorben, von den behandelten Tieren lebten

noch 13, d. h. 52 %.

Die Versuchsergebnisse nach der Immunisierung mit lebenden Amöben von A. lugdunensis SH-565 sind in Abb. 2 wiedergegeben. An dieser Stelle ist anzumerken, daß bei Abb. 2 sowie den folgenden Abbildungen (Abb. 3 und 4) nur die Beobachtungen bis zum 20. Tag nach dem Challenge berücksichtigt werden, da sich die Ergebnisse später nicht weiter veränderten.

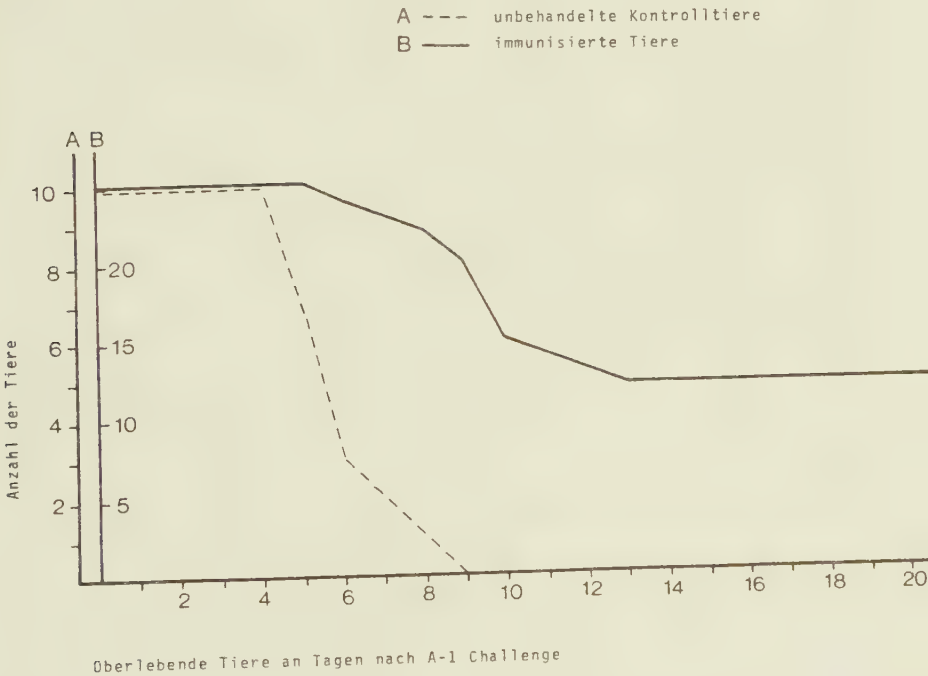


Abb. 2: Überlebende Mäuse nach Immunisierung mit lebenden Amöben von A. lugdunensis SH-565 und anschließendem Challenge mit A-1

munisierung	Anzahl der lebenden Mäuse an Tagen nach A-1 Challenge												insgesamt überlebende Tiere	
	0 - 4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-30	Anzahl	%
Dugdun.SH 565	25	25	24	23	22	20	15	14	13	12	12	12	12	48
ntrolle	10	7	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sp.SA	25	25	22	21	19	16	13	10	9	9	9	9	9	36
trolle	10	8	7	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
p.WB	25	24	20	18	16	13	11	10	8	8	8	8	8	32
trolle	10	10	7	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
astell.X 133	25	22	18	15	13	10	9	7	6	6	6	6	6	24
trolle	10	9	8	6	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 1: Immunisierung mit definierten Amöbenstämmen

3.2. Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Antigenen aus definierten apathogenen und pathogenen Amöbenstämmen und Belastung mit einem lebenden, pathogenen Stamm

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht (s. Seite 39), starben auch hier alle Kontrolltiere bei allen Versuchsgruppen, nachdem sie mit pathogenen Amöben infiziert worden waren. Bei einem

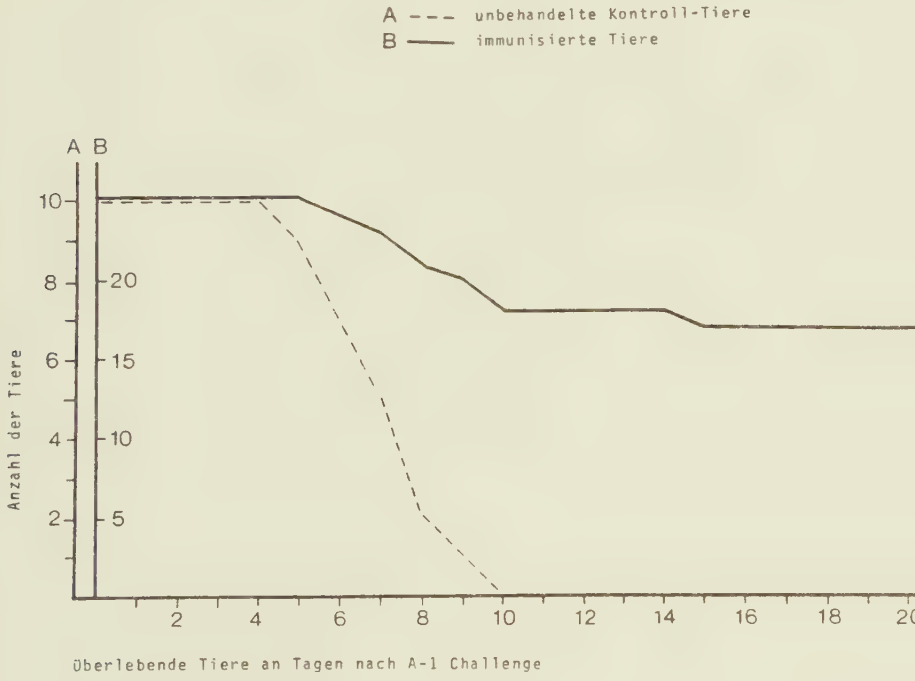


Abb. 3: Überlebende Mäuse nach Immunisierung mit abgetöteten Amöben von A. culbertsoni A-1 und anschließendem Challenge mit A-1

Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen zeigt es sich, daß bei den zuvor immunisierten Tieren zwischen 44 % und 64 % überlebten. Am deutlichsten ist die Schutzwirkung bei den mit aus pathogenen Amöben A. culbertsoni A-1 gewonnenen Antigenen behandelten Mäusen, bei denen 16 von 25 Tieren, nämlich 64 %, überlebten (Abb. 3).
Bei den mit A. lugdunensis und A. castellanii behandelten Mäusen überlebten je 13 von 25, d. h. 52 %.
Von den mit SA und WB immunisierten Tieren überlebten jeweils 11, d. h. 44 %.

unisierung	Anzahl der lebenden Mäuse an Tagen nach A-1 Challenge												insgesamt überlebende Tiere	
	0 - 4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-30	Anzahl	%
ulb. A 1	25	25	24	23	21	20	18	18	18	18	18	16	16	64
ntrolle	10	9	7	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ugdun.SH 565	25	25	25	24	20	17	15	14	14	13	13	13	13	52
ntrolle	10	9	7	6	4	3	2	1	1	1	1	0	0	0
castell.X 133	25	24	23	21	18	16	15	14	14	13	13	13	13	52
ntrolle	10	9	7	5	3	2	1	1	1	1	1	0	0	0
sp.SA	25	24	22	22	19	13	13	13	13	13	13	11	11	44
ntrolle	10	10	8	6	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
sp.WB	25	24	20	18	15	13	11	11	11	11	11	11	11	44
ntrolle	10	9	7	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2: Immunisierung mit Antigenen aus definierten Amöbenstämmen

3.3. Immunisierung mit Überständen aus Amöbenkulturen

Wie bereits bei den anderen Versuchen beobachtet, zeigt sich auch hier eine 100%ige Letalität der unbehandelten Kontrolltiere (s. Tab. 3, Seite 42). Dagegen überlebten bei beiden Versuchsgruppen einige wenige Tiere. Von den mit SA behandelten 25 Mäusen lebten nach 30 Tagen noch

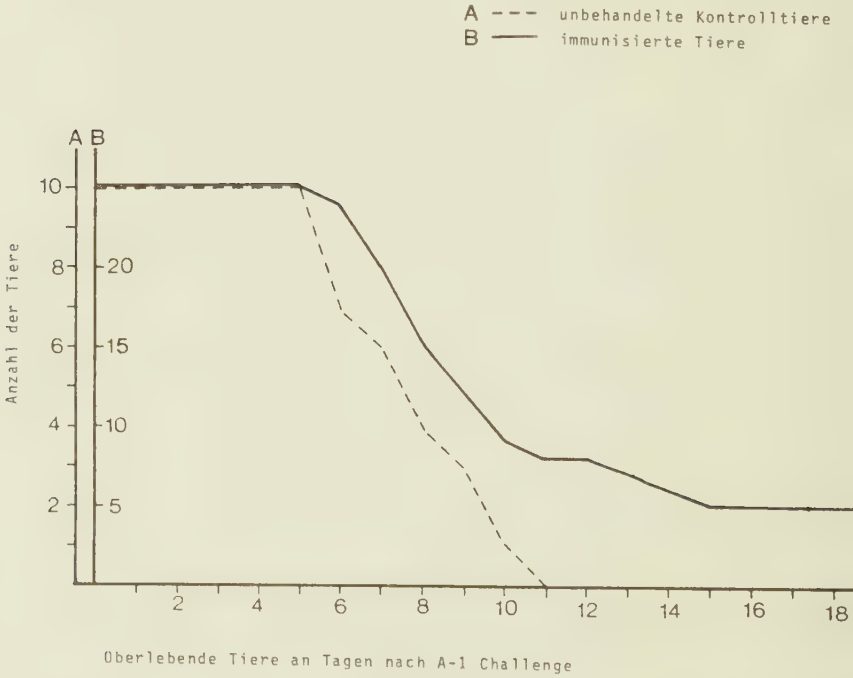


Abb. 4: Oberlebende Mäuse nach Immunisierung mit Kulturüberstand von A. culbertsoni A-1 und anschließendem Challenge mit A-1

fünf Tiere, d. h. 20 %; von den mit A. culbertsoni A-1 vorbehandelten Tieren lebten von 24 Mäusen noch vier, d. h. 16 % (s. Abb. 4). Zu berücksichtigen ist hier, daß am 11. Tag, als bereits alle unbehandelten Kontrolltiere gestorben waren, von den mit Kulturüberstand von A. culbertsoni A-1 immunisierten Tieren noch 32 %, d. h. 8 von 25 Mäusen am Leben waren, obwohl diese Gruppe im Vergleich zu der anderen Gruppe nach 30 Tagen weniger überlebende Tiere aufzuweisen hatte.

munisierung	Anzahl der lebenden Mäuse an Tagen nach A-1 Challenge												insgesamt überlebende Tiere	
	0 - 4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-30	Anzahl	%
sp. SA	25	23	20	14	10	9	8	6	6	6	6	5	5	20
trolle	10	9	7	6	4	3	1	1	1	0	0	0	0	0
ulb. A 1	25	25	24	20	15	12	9	8	8	7	6	4	4	16
trolle	10	10	7	6	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3: Immunisierung mit Oberständen aus Amöbenkulturen

3.4. Beeinflussung der Immunreaktion durch verschiedene Erreger

Bei diesem Versuch starben, wie aus Tabelle 4 hervorgeht (s. Seite 45), fast alle Kontrolltiere bis auf eines, d. h. 4 % der Tiere überlebten nach der Infektion mit A-1. Bei den anderen Versuchsgruppen hingegen, die mit verschiedenen Erregern bzw. apathogenen Amöben vorbehandelt wurden, zeigt sich eine höhere Überlebensrate. Anzumerken ist hier,

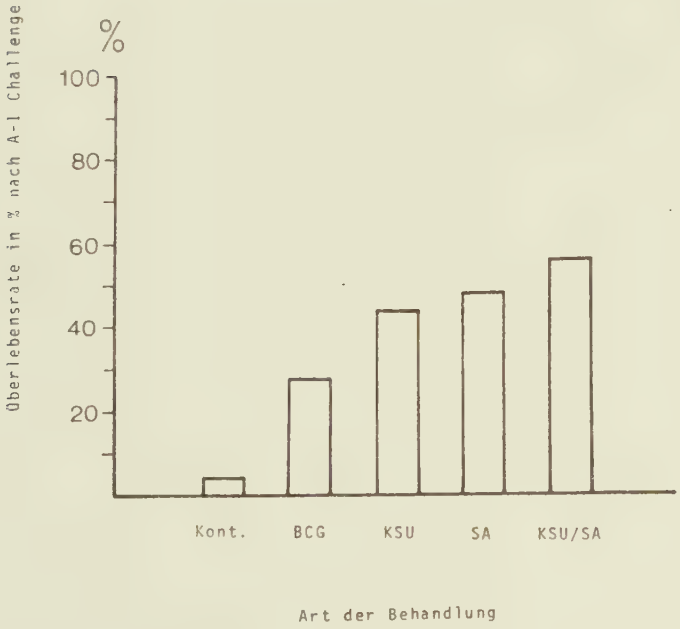


Abb. 5: Überlebensrate der Mäuse nach unterschiedlichen Behandlungen und anschließendem Challenge mit A-1

daß von der Gruppe, die sowohl mit Toxoplasma wie auch A. sp. SA behandelt wurde, schon vor dem Challenge neun Tiere gestorben waren, so daß zur Infektion nur 16 Tiere zur Verfügung standen. Von diesen 16 überlebten jedoch neun, nämlich 56 %.

Im Vergleich mit den nur mit SA vorbehandelten Tieren fällt auf, daß bei diesen die Überlebensrate 12 von 25 Mäusen betrug, d. h. 48 % (s. Abb. 5).

Bei den mit Toxoplasma behandelten 25 Mäusen überlebten 11, d. h. 44 %, und von den mit BCG vorbehandelten Mäusen überlebten 7, d. h. 28 %.

Art der Behandlung	Anzahl der lebenden Mäuse an Tagen nach A-1 Challenge												insgesamt überlebende Tiere	
	0 - 4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-30	Anzahl	%
Toxoplasma gondii KSU	25	25	24	24	20	15	11	11	11	11	11	11	11	44
BCG Cannaught	25	21	17	12	10	9	8	8	8	7	7	7	7	28
A.sp.SA	25	25	23	19	17	15	15	15	14	12	12	12	12	48
Toxoplasma + A.sp.SA	16	15	14	13	13	13	13	12	12	10	9	9	9	56
Kontrolle	25	22	15	12	7	4	3	2	1	1	1	1	1	4

Tabelle 4: Immunisierung mit verschiedenen Erregern

3.5. Immunisierung mit Bakterienzellwandantigenen

Bei diesem Versuch bestand die Gruppe der Kontrolltiere aus 20 Mäusen, von denen alle Tiere innerhalb der ersten 13 Tage nach dem Challenge starben.
Von den mit MDP behandelten 10 Mäusen überlebten vier, von den mit TDM behandelten Tieren überlebten drei, und von den mit einer Kombination aus TDM und MDP behandelten 10 Mäusen überlebte nur eine Maus (s. Tab. 5, Seite 47).

nisierung	Anzahl der lebenden Mäuse an Tagen nach A-1 Challenge												insgesamt Überlebende Tiere	
	0 - 4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-30	Anzahl	%
P	10	9	9	8	6	6	5	5	4	4	4	4	4	40
M	10	10	10	8	7	6	5	4	3	3	3	3	3	30
P + TDM	10	9	7	5	3	2	1	1	1	1	1	1	1	10
trolle	20	18	15	12	9	7	5	3	2	1	0	0	0	0

Tabelle 5: Immunisierung mit Antigenen aus Bakterienzellwand (MDP = Muramyldipeptid; TDM = Trehalosedemicolat)

3.6. Beeinflussung der Immunreaktion durch Immunsuppressiva

Aus Tabelle 6 (s. Seite 50) geht deutlich hervor, daß von den 10 Versuchstieren, die keinerlei Vorbehandlung erfuhren, sondern nur mit pathogenen Amöben infiziert worden waren, innerhalb von 11 Tagen alle Tiere starben.

Gruppe fünf hingegen, in der die Tiere immunisiert worden waren, zeigt eine erheblich höhere Oberlebensrate, sie betrug sieben Tiere von 10, d. h. 70 %.
Bei den vier Gruppen von Versuchstieren, die immunisiert und anschließend mit Immunsuppressiva behandelt worden waren, war die Mortalitätsrate deutlich höher, wenn sie auch je nach verwendetem Immunsuppressivum Schwankungen aufweist.

Eine sehr geringe Überlebensrate zeigt die Gruppe der Tiere, die mit Cyclophosphamid behandelt worden waren. In dieser Gruppe lebten nach 30 Tagen noch 2 Tiere, d. h. 20 %.

Bei der mit Carragheenan behandelten Gruppe von 10 Mäusen überlebten nur 3, d. h. 70 % der Tiere waren gestorben.

Von den 10 Mäusen, die Silica erhalten hatten, konnten vier Mäuse überleben, d. h. 40 %. Die höchste Überlebensrate zeigte sich bei den mit Methylprednisolon behandelten Tieren, sie betrug 6 von 10 Tieren, d. h. 60 %. (s. Abb. 6).

Bei den vorgenannten vier Gruppen wurden jeweils fünf Tiere nicht immunisiert, sondern nur mit den verschiedenen Immunsuppressiva behandelt.

Nachdem diese Tiere anschließend mit den pathogenen A-1 infiziert wurden, starben alle diese Tiere innerhalb weniger Tage. Außerdem gab es in jeder Gruppe jeweils fünf Tiere, bei denen nach der Immunisierung und Behandlung mit Immunsuppressiva kein Challenge erfolgte; diese Tiere überlebten alle.

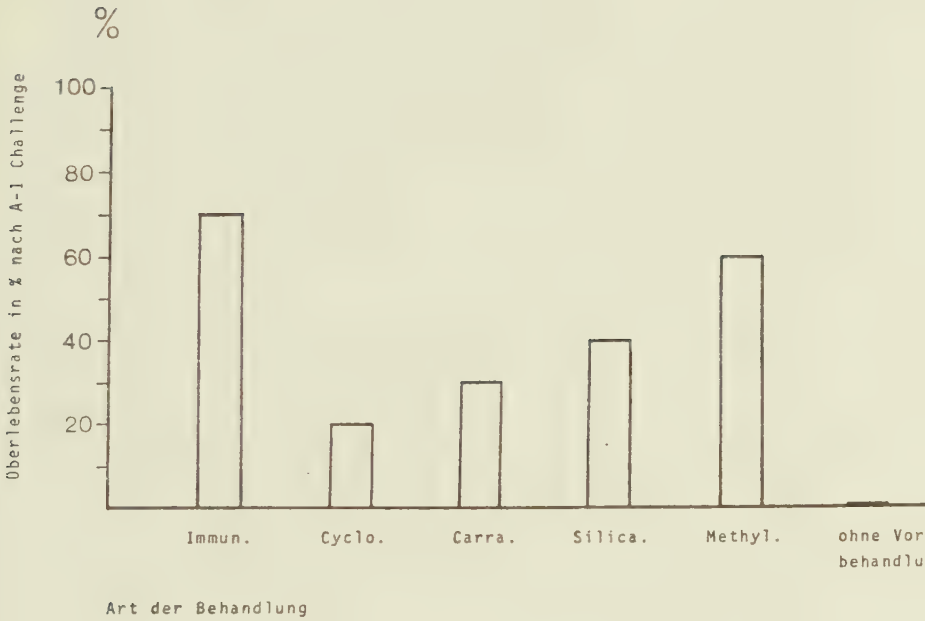


Abb. 6: Überlebensrate der immunisierten Mäuse nach Behandlung mit Immunsuppressiva und anschließendem Challenge mit A-1

ppe	Art der Behandlung	Anzahl der lebenden Mäuse an Tagen nach A-1 Challenge											insgesamt überlebende Tiere	
		0 - 4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14-30	Anzahl	%
	Cyclophosphamid	10	9	8	6	5	3	3	2	2	2	2	2	20
	Methylprednisolon	10	10	10	10	10	8	8	7	7	6	6	6	60
	Silica	10	10	10	10	8	7	6	5	4	4	4	4	40
	Carragheenan	10	8	5	4	4	3	3	3	3	3	3	3	30
	nur Immunisierung	10	10	10	10	8	8	7	7	7	7	7	7	70
	ohne Vorbehandlung	10	10	9	7	5	3	2	1	0	0	0	0	0

4. DISKUSSION

Bei den hier besprochenen Versuchen erfolgte die Immunisierung weitgehend mit apathogenen lebenden Amöben, mit abgetöteten pathogenen und apathogenen Amöben, sowie mit Kulturüberstand durch intranasale Übertragung, was möglicherweise auch dem Infektionsweg entspricht. Für eine Immunisierung mit Akanthamöben auf intranasalem Wege ist in der Literatur bisher keinerlei Hinweis zu finden.

4.1. Immunisierung mit lebenden Amöben

Die Schutzwirkung nach einer Immunisierung mit lebenden, weithin apathogenen Akanthamöben kann, wie aus den Ergebnissen hervorgeht, im allgemeinen als befriedigend bezeichnet werden. Sie betrug zwischen 24 und 48 %. Da bisher, wie schon erwähnt, keinerlei Angaben über Immunisierungsversuche mit lebenden Akanthamöben auf nasalem Wege vorliegen, sei hier ein Vergleich gestattet mit den Versuchen von JOHN et al. (1977)[58], die mit lebenden Naegleria fowleri experimentierten. Sie nahmen ihre Immunisierungsversuche an DUB/ICR-Mäusen vor. Dazu wählten sie verschiedene Wege, neben i.p.- und i.v.-Injektionen übertrugen sie die Amöben auch intranasal auf die Tiere. Nach einer intranasalen Immunisierung der Mäuse mit einer Dosis von 10^3 Naegleria fowleri erfolgte nach drei Wochen die Infektion (i.n.) mit 10^6 Naegleria fowleri. Lediglich bei 9 % der Mäuse zeigte sich eine Schutzwirkung.
Bei den vorliegenden Versuchen, bei denen erstmals eine Immunisierung mit Akanthamöben auf intranasalem Wege durchgeführt wurde, liegt die Schutzwirkung sichtlich höher, nämlich bis zu 48 %.
Es darf hierbei jedoch nicht außer acht gelassen werden,

daß JOHN et al. [58] bei ihren Versuchen zur Immunisierung eine wesentlich geringere Anzahl von Naegleria benutzten als bei der späteren Infektion. Bei den hier besprochenen Versuchen mit Akanthamöben wurde hingegen sowohl zur Immunisierung wie auch beim späteren Challenge jeweils die gleiche hohe Anzahl von Trophozoiten übertragen, und zwar $5x10^4$, womit die Immunisierungsdosis von vornherein wesentlich höher lag als bei JOHN et al.

THONG et al. (1978; 1980)[101;103] führten ebenfalls Versuche mit lebenden Naegleria fowleri durch. Sie immunisierten die Versuchstiere durch i.p.-Injektionen. Der anschließende Challenge wurde intranasal durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich, daß von den immunisierten Tieren zwischen 27 und 34 % überlebten, bei den unbehandelten Kontrolltieren betrug die Oberlebensrate 0 %.

Versuche mit A. culbertsoni führte 1971 CULBERTSON[25] durch. Er immunisierte seine Versuchstiere mit den hochvirulenten A. culbertsoni A-1, nahm jedoch die Immunisierung ebenfalls nicht intranasal vor, sondern er immunisierte durch i.p.-Injektionen mit lebenden Amöben. Nach zwei Wochen erfolgte die Infektion mit lebenden Amöben auf intranasalem Wege. Die Schutzwirkung war beachtlich, von 10 Tieren überlebten bis zu 8. In einer zweiten Versuchsreihe immunisierte CULBERTSON[25] seine Versuchstiere wiederum i.p., diesmal jedoch mit apathogenen A. culbertsoni A-5. Die Ergebnisse zeigten, daß die Oberlebensrate nach dieser Immunisierung außerordentlich niedrig lag, von 10 Mäusen überlebten nur zwei.

Bei den vorliegenden Versuchen mit verschiedenen apathogenen Akanthamöbenstämmen zeigte die Immunisierung mit Acanthamoeba lugdunensis die beste Schutzwirkung. Hier überlebten 48 % der Versuchstiere, d. h. fast die Hälfte. Wie bereits in dem Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, zeigte A. lugdunensis eine schwache Virulenz, daher wurde versucht, durch einen Clon und folgende Weiterzüchtung die Virulenz zu beseitigen.

Die relativ hohe Schutzwirkung durch eine Behandlung mit A. lugdunensis wie auch die durch einige andere Akanthamöbenstämme erzielte Schutzwirkung könnte, neben anderen Faktoren, darauf beruhen, daß die weitgehend apathogenen Amöbenstämme, und hier besonders A. lugdunensis SH-565, in ihren Antigenen teilweise mit A. culbertsoni A-1 übereinstimmen.

Wie VISVESVARA & BALAMUTH (1975)[105] in ihrer Antigen-Analyse bei freilebenden Amöben herausfanden, verfügen pathogene Naegleria fowleri und apathogene N. gruberi über einige gemeinsame Teil-Antigene; auch bei A. culbertsoni und A. rhysodes stieß man auf eine "Kreuz-Reaktion" (VISVESVARA & BALAMUTH, 1975)[105].

SINGH & SHARMA (1983)[95] fanden bei ihren GDP-Versuchen (Gel diffusion precipitin), daß bei A. culbertsoni, A. rhysodes, A. polyphaga und A. astronyxis einige Antigene übereinstimmten.

Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, daß mit verschiedenen Amöbenarten bzw. -stämmen eine Immunisierung bei einem beträchtlichen Prozentsatz der Versuchstiere gelang. Daher kann man annehmen, daß hier ein ähnliches Phänomen wie bei den vorgenannten Versuchen (SINGH & SHARMA; VISVESVARA & BALAMUTH)[95;105] auftrat, nämlich daß auch die hier verwendeten apathogenen Amöben in ihren Antigenen einige gemeinsame Komponenten mit den Antigenen von A. culbertsoni besitzen und eine Immunisierung hervorgerufen wurde.

4.2. Immunisierung mit abgetöteten Amöben

Die Immunisierungsversuche mit nichtvermehrungsfähigen pathogenen sowie apathogenen Amöbenstämmen zeigten deutlich

die beste Schutzwirkung.
Die höchste Immunisierung wurde mit den Antigenen von A. culbertsoni A-1 erreicht. Über ähnliche Versuche durch abgetötete A. culbertsoni-Antigene berichteten ROWAN-KELLY und FERRANTE (1984)[85]. Sie immunisierten BALB/C-Mäuse auf dem i.p.-Wege mit zuvor durch Ultraschall abgetöteten Acanthamoeba culbertsoni A-1. Sie kamen damit bei mehrmaliger Immunisierung auf eine Überlebensrate von mehr als 80 %. Bei einmaliger Immunisierung lag die Überlebensrate bei 40 %. Bei ihren anderen Versuchen zur Immunisierung, bei denen sie eine einmalige Impfung i.p. mit apathogenen Amöbenarten bzw. -stämmen (A. culbertsoni A-5, HN-3 und A. polyphaga MRK-IA) mit anschließendem Challenge i.n. vornahmen, erzielten sie erheblich niedrigere Ergebnisse.

Bei einem Vergleich der Versuche von ROWAN-KELLY und FERRANTE[85] mit den vorliegenden Versuchen zeigt es sich, daß nach einer Immunisierung mit A. culbertsoni A-1 die Schutzwirkung am größten ist. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die Infektion durch den gleichen Amöbenstamm erfolgte, d. h. die Immunisierung vollzog sich möglicherweise durch homologe Antigene. Dies führte zu einer spezifischen Immunreaktion und gab den Tieren einen besseren Schutz gegen die A-1 Infektion.

Allgemein geht man davon aus, daß gegen die Parasiteninfektion ein lebendes Antigen einen besseren Schutz bietet als ein nichtvermehrungsfähiges (COX, 1978)[21]. Dennoch zeigen die hier durchgeführten Versuche, daß man mit abgetöteten Antigenen eine bessere Schutzwirkung erzielen konnte als mit lebenden.

Wie aus den Untersuchungen von ROWAN-KELLY und FERRANTE (1984)[85] hervorgeht, konnte durch eine mehrmalige Immunisierung mit abgetöteten Amöben eine bessere Schutzwirkung erzielt werden als durch eine einmalige Immunisierung. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man annehmen, daß die hier

beobachtete geringere Schutzwirkung nach einer Immunisierung mit lebenden Amöben durch die einmalige Immunisierung erklärt werden könne und daß durch eine mehrmalige Immunisierung mit lebenden Amöben und einer anschließenden Belastung mit pathogenen Amöben die Überlebensrate der Tiere erhöht werden konnte. Dem widersprechen jedoch die Beobachtungen von CULBERTSON (1971)[25] bei Akanthamöben und von THONG et al. (1980)[103] bei Naeglerien.

Nach einer einmaligen Immunisierung i.p. mit lebenden A. culbertsoni A-1 und einem nachfolgenden Challenge mit A-1 trat bei acht von 10 Mäusen ein Schutzeffekt auf (CULBERTSON 1971)[25]. Immunisierte er die Tiere auf die gleiche Weise zweimal bzw. dreimal, dann erhöhte sich dennoch die Zahl der überlebenden Tiere nicht.

THONG et al. (1980)[103] beobachteten bei den Tieren eine Überlebensrate von 34 %, wenn sie die Tiere zweimal mit lebenden Naegleria fowleri immunisiert hatten. Nach einer mehrmaligen Immunisierung mit lebenden Naegleria fowleri sank die Immunität im Vergleich zu den Ergebnissen nach zweimaliger Immunisierung jedoch ab.

Die hier nachgewiesene bessere Schutzwirkung durch abgetötete Amöben könnte damit erklärt werden, daß durch das Einfrieren und Auftauen beim Abtöten die Antigene sich aus den Amöben lösten und in gelöster Form in der Amöbensuspension (Antigensuspension) konzentriert waren. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß die Immunisierung i.n. erfolgte: die Lösung konnte von den Epithelzellen der Nasenschleimhaut leichter aufgenommen werden und bewirkte somit eine Immunität.

4.3. Immunisierung mit Überständen aus Amöbenkulturen

Nach der viermaligen intranasalen Immunisierung mit Kulturüberstand und einer nachfolgenden Infektion mit A. culbertsoni A-1 zeigte sich eine gewisse Schutzwirkung, obgleich sie ziemlich niedrig lag, d. h. bei 16 bzw. 20 %. Der Kulturüberstand der Amöben wurde hierzu, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, durch einen Mikrofilter filtriert. Die anschließende Kontrolle auf zwei Agarplatten ergab, daß keinerlei Organismen mehr vorhanden waren. Dennoch trat eine gewisse Schutzwirkung auf. Dieser Effekt könnte möglicherweise darauf beruhen, daß die Amöben während des Wachstums bestimmte Stoffe ausscheiden, die in das Medium gelangten und nach einer intranasalen Instillation einen gewissen Schutz gegen pathogene Amöben boten.

Interessant sind auch die Experimente von ROWAN-KELLY und FERRANTE (1984)[85] zur Immunisierung durch Kulturüberstand. Sie verabreichten ihren Versuchstieren sechsmal i.p. eine Dosis von 0,5 ml von Kulturüberstand von A. culbertsoni A-1 in vierzehntägigem Abstand. Die Infektion mit A. culbertsoni A-1 Erregern erfolgte intranasal. Die Überlebensrate war ziemlich hoch: sie betrug 50 %.
Dieses abweichende Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, daß ROWAN-KELLY und FERRANTE[85] eine wesentlich höhere Dosis anwendeten als dies bei den vorliegenden Versuchen der Fall war. Geht man davon aus, daß in den Kulturüberständen Antigene enthalten sind, dann scheinen sie dort jedoch nur in geringer Konzentration vorhanden zu sein. Eine Immunisierung mit Kulturüberständen ist möglicherweise um so erfolgreicher, je höher die Dosis ist bzw. je öfter die Immunisierung durchgeführt wird.

In diesem Zusammenhang interessieren die Arbeiten von THONG et al. (1979; 1980)[102,103]. Sie führten Versuche mit Kulturüberständen von Naegleria fowleri durch. Während einer Versuchsreihe immunisierten sie Mäuse mit 0,25 ml Kulturüberstand i.p. und infizierten sie anschließend mit $5x10^4$

Naegleria fowleri intranasal (THONG et al. 1979)[102]. Die Überlebensrate betrug nach einmaliger Immunisierung 11 %, nach dreimaliger Immunisierung 25 %. In einer anderen Versuchsreihe immunisierte THONG die Mäuse sechsmal in vierzehntagigem Abstand mit je 0,3 ml Kulturüberstand von Naegleria fowleri. Eine Woche nach der letzten Immunisierung folgte die intranasale Infektion mit Naegleria fowleri. Bei diesen Experimenten betrug die Überlebensrate 67 % (THONG et al. 1980)[103]. Das läßt darauf schließen, daß eine Vergrößerung der Immunisierungsdosis auch zu einer Erhöhung der Überlebensrate führt.

Bei den hier besprochenen Versuchen immunisierte ich die Mäuse viermal mit 25 µl Kulturüberstand, d. h. mit einer wesentlich geringeren Dosis als THONG et al.[102,103] oder ROWAN-KELLY und FERRANTE[85] sie anwendeten. Eine höhere Dosis war bei diesen Experimenten ausgeschlossen, da die Immunisierung intranasal erfolgte, im Gegensatz zu der i.p. Immunisierung der anderen Untersucher. Da die Versuchstiere sehr klein waren (15 g), hätte eine höhere Gabe in die Nase zu Schädigungen führen können. Es wäre zu untersuchen, ob eine wesentlich häufigere Immunisierung mit Kulturüberständen zu höheren Überlebensraten geführt hätte, ein Versuch, der bei den vorliegenden Experimenten ausgeschlossen war, da alle Versuche unter gleichen zeitlichen Bedingungen durchgeführt wurden, d. h. jeweils am 19. Tag nach der ersten Immunisierung erfolgte die Infektion.

Bei einem Vergleich der Arbeiten mit Naegleria fowleri und der mit A. culbertsoni A-1 wird deutlich, daß die Überlebensrate nach einer Immunisierung und anschließender Infektion mit Naegleria fowleri oder Acanthamoeba culbertsoni unterschiedlich ist. Während man bei A. culbertsoni durch eine Immunisierung mit lebenden oder abgetöteten Amöben eine hervorragende Schutzwirkung erzielen konnte, bietet bei Naegleria fowleri eine Immunisierung mit Kulturüberstand die beste Schutzwirkung.

4.4 Mechanismen der Immunreaktion im Wirt nach einer Immunisierung durch lebende, abgetötete Amöben bzw. Amöbenkulturüberstand

Nach welchem Mechanismus im Wirtsorganismus der Widerstand gegen eine Akanthamöben-Infektion aufgebaut wird, ist bisher noch wenig erforscht. Untersuchungen über einen derartigen Mechanismus wurden bisher in überwiegendem Maße mit N. fowleri durchgeführt, die verschiedenen Untersucher kamen dabei zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen. Über die terminierenden Faktoren gibt es immer noch keine klaren Angaben.

THONG et al. (1978)[100] führten Versuche mit Mäusen durch, von denen eine Gruppe das Serum zuvor behandelter Mäuse injiziert erhielt, während der anderen Gruppe Milzzellen vorbehandelter Mäuse eingespritzt wurden. Die Kontrollgruppe erhielt ebenfalls Serum und Milzzellen, jedoch von nicht zuvor immunisierten Mäusen. Nach dem Challenge mit Naegleria fowleri zeigte es sich, daß die Oberlebensrate bei den mit Serum behandelten Mäusen 21 % betrug, während von den übrigen Tieren keines überlebte. Beim Agglutinationstest wies das Blutserum immunisierter Mäuse einen Titer von 1 : 256 auf. Bei den Kontrolltieren betrug der Titer 1 : 2.

Andererseits stellten DIFFLEY et al. (1976)[34] bei ihren Versuchen mit Naegleria fowleri an Meerschweinchen eine Überempfindlichkeit vom Spättyp fest; sie zogen daraus die Schlußfolgerung, daß bei der Abwehr von pathogenen Naegleria-Infektionen die zelluläre Immunität eine wichtige Rolle spielt.

Auch CURSON et al. (1980)[27] befaßten sich mit der Rolle der zellulären Immunität gegenüber freilebenden pathogenen Amöben. Aufgrund von Untersuchungen mit Naegleria kamen sie zu der Ansicht, daß eine Immunisierung mit apathogenen freilebenden Amöben das zelluläre Immunsystem auch gegen pathogene

Amöben aktivieren kann.

Nach einer ein- bis dreimaligen Gabe i.n. von N. fowleri Trophozoiten konnten HAGGERTY & JOHN (1982)[50] bei Mäusen keine Agglutination im Serum feststellen; eine solche Reaktion war jedoch nach zwei- bzw. dreimaliger Gabe i.v. zu erzielen.

Zu dieser Fragestellung führten FERRANTE und ROWAN-KELLY (1983)[40] Untersuchungen mit Akanthamöben durch: sie konnten dabei nachweisen, daß im normalen menschlichen Blutserum ein Faktor enthalten ist, der A. culbertsoni innerhalb von fünf bis zehn Minuten abtötet. Erhitzte man allerdings das Serum 30 Minuten lang auf 56° C oder behandelte man es mit Zymosan, so ging diese amöbizide Wirkung verloren. Man vermutet, daß in vivo Akanthamöben entweder durch Läsionen der Zellmembran als Folge einer gemeinsamen Wirkung der Komplement-Faktoren C - 5 bis C - 9 zugrunde gehen oder infolge einer Opsonisation durch C 3b von Phagozyten abgetötet werden.

REILLY et al. (1983)[83] befaßten sich ebenfalls mit der Immunität gegenüber N. fowleri. Dabei konzentrierten sie sich vor allem auf die Rolle der humoralen Immunität gegenüber N. fowleri. So konnten sie nach einer Infektion mit N. fowleri im Blut der infizierten Mäuse eine erhöhte Agglutinationsaktivität und eine höhere Konzentration von Immunglobulin M und G feststellen. Obwohl eine deutliche humorale Reaktion erkennbar war, trat interessanterweise nur eine geringfügig erhöhte Schutzwirkung bei den Tieren auf.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse und der hier vorliegenden Experimente - insbesondere der Versuchsresultate nach der Behandlung mit Immunsuppressiva (s. Kapitel 3.6. "Behandlung mit Immunsuppressiva") - kann man annehmen, daß im Abwehrmechanismus nach der Immunisierung gegen Akanthamöben-Infektionen neben der humoralen Immunität auch der

zelluläre Immunmechanismus eine bedeutende Rolle spielt.

Wenn man sich mit dem Mechanismus der Schutzwirkung befaßt, erhebt sich die Frage, auf welchem Wege die Erreger abgetötet werden. THONG et al. (1983)[104] widmeten sich diesem Problem in Untersuchungen mit Mäusen, die sie mit homologen Antigenen - abgetöteten Amöben oder Kulturüberstand - von Naegleria fowleri immunisierten und anschließend mit den gleichen Erregern infizierten. Die Befunde der histologischen Untersuchungen legten den Schluß nahe, daß die Erreger überwiegend bereits auf der Nasenschleimhaut abgetötet werden, ehe sie ins Zentralnervensystem gelangen können.

Ähnliche Untersuchungen mit Akanthamöben liegen bisher noch nicht vor. Im Plattentest konnte bei der vorliegenden Untersuchung in den Gehirnen der überlebenden Tiere kein Amöbenbefall mehr nachgewiesen werden.

Man kann annehmen, daß bei einer Immunisierung die Schutzwirkung auf ähnliche Weise einsetzt und die Vernichtung der Erreger bewirkt. Es ist hierbei jedoch zu berücksichtigen, daß N. fowleri über die Nasenschleimhaut direkt ins Gehirn gelangen und dort eine Hirnhautentzündung hervorrufen. Von Akanthamöben hingegen ist bekannt, daß sie überwiegend von der Lunge aus auf hämatogenem Wege ins Gehirn eindringen und sekundär eine Hirnhautentzündung verursachen (MARTINEZ et al., 1975)[68]. Aus diesem Grunde ist das Problem, welche Mechanismen einer Immunisierung gegen Akanthamöben zugrundeliegen, anders anzugehen und macht noch nähere Untersuchungen erforderlich.

4.5. Beeinflussung der Immunreaktion durch verschiedene Erreger

Der Versuch einer Immunisierung mit anderen Mikroorganismen - per os mit Toxoplasma, i.v. mit BCG - gegenüber einer Infektion durch A. culbertsoni zeigte eine befriedigende Schutzwirkung. Je nach Art des für die Immunisierung angewandten Erregers ist die Überlebensrate jedoch unterschiedlich. Bei diesen Untersuchungen wurde das zuvor eingehaltene Zeitschema geändert: die Infektion mit pathogenen A. culbertsoni erfolgte erst 30 Tage nach der Immunisierung mit den verschiedenen Mikroorganismen. Dieses Vorgehen war in der Überlegung begründet, daß während dieser Zeit eine Toxoplasmose in ein latentes Stadium übergegangen sein sollte. Um einen objektiven Vergleich zu ermöglichen, erfolgte auch nach der Immunisierung mit anderen Mikroorganismen der Challenge erst nach 30 Tagen.

Nach einer BCG-Immunisierung überlebten 28 % der Mäuse, nach der mit Toxoplasma 44 % und nach der kombinierten Immunisierung mit Toxoplasma und Acanthamoeba sp. SA war die Überlebensrate 56 %. Bei der parallel verlaufenden Immunisierung ausschließlich mit Acanthamoeba sp. SA betrug die Oberlebensrate 48 %.

Mit 28 % war der Anteil der Überlebenden nach einer Immunisierung mit BCG-Erregern am niedrigsten in der Versuchsreihe. Bisher liegen in der Literatur noch keinerlei Angaben über die Erfolge einer Immunisierung mit BCG-Erregern gegenüber freilebenden pathogenen Akanthamöben vor. BCG wird häufig als ein unspezifisches Immunstimulans gegenüber einer Reihe von Erkrankungen angewandt, z. B. bei Tumorerkrankungen (CLARK et al. 1977)[20].

Untersuchungen, bei denen BCG zur Immunisierung gegenüber anderen Protozoen-Infektionen verwendet wurde, stellten verschiedene andere Forscher an. CLARK & ALLISON (1976)[19] beobachteten bei ihren Experimenten, daß durch eine

Immunisierung mit BCG-Erregern eine hervorragende Schutzwirkung gegenüber Babesia zu erreichen war. Sie erklärten diese Wirkung damit, daß die BCG-Erreger neben anderen Faktoren hauptsächlich Makrophagen stimulieren und durch eine unspezifische Immunreaktion die Protozoen vernichten (CLARK et al. 1977)[20].

Die Rolle der aktivierten Makrophagen gegenüber einer Protozoen-Infektion haben auch SCHWARTZBERG et al. (1975)[91] bewiesen. Bei einer in vitro-Untersuchung stellten sie fest, daß aktivierte Makrophagen Toxoplasma abtöteten.

Dagegen zeigte sich, daß BCG gegenüber einer Infektion durch Trypanosoma cruzi nicht wirksam war (KUHN et al. 1975)[63]. Eine erfolgreiche Immunisierung mit BCG oder anderen Bakterien ist davon abhängig, auf welchem Wege die Erreger dem Versuchstier übertragen werden, und von dem Zeitraum, der zwischen der Immunisierung und der Infektion verstreicht, sowie von der Höhe der BCG-Dosis (CLARK & ALLISON 1976)[19].

Die hier beobachtete niedrige Überlebensrate nach einer Immunisierung der Mäuse mit BCG könnte, neben anderen Faktoren, von der Dosis der Keime abhängen oder auch davon, daß der Zeitraum von 30 Tagen, der zwischen Immunisierung und Challenge lag, ungünstig war.
Bei den Mäusen, die vor der Infektion eine orale Gabe von Toxoplasma erhalten hatten, betrug die Überlebensrate 44 %. Dies zeigt, daß durch die Behandlung eine gute Schutzwirkung erzielt worden war. Toxoplasma gondii, ein Gewebeparasit von Mensch und Tier, wurde verschiedentlich in Experimenten gegen Bakterien (RUSKIN & REMINGTON 1968)[86] und Pilze (GENTRY & REMINGTON 1971)[44] getestet. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß mit Toxoplasma chronisch infizierte Tiere einen gewissen Schutz gegen die Erreger aufbauten. ARAUJO & NASCIMENTO (1977)[3] fanden, daß eine chronische Infektion mit Toxoplasma auch eine Wirkung gegenüber einer Trypanosoma cruzi-Infektion zeigt. Es gibt jedoch in der Literatur bisher

keinerlei Angaben in bezug auf Experimente mit freilebenden pathogenen Amöben. REMINGTON et al. (1972)[84] erklärten die durch eine chronische Infektion mit Toxoplasma gondii oder Besnoita jellisoni hervorgerufene Schutzwirkung bei Tieren damit, daß durch die Infektion die Makrophagen aktiviert und dadurch in den Stand gesetzt seien, die anderen Organismen abzutöten.

Bei den hier besprochenen Versuchen mit Akanthamöben könnte auf diese Weise auch die gute Überlebensrate der zuvor oral mit Toxoplasma infizierten Mäuse erklärt werden, daß nämlich auch hier die Makrophagen aktiviert wurden und - als unspezifischer Schutzmechanismus - die Akanthamöben am Vordringen hinderten.

ARAUJO & NASCIMENTO (1977)[3] sahen es andererseits auch als möglich an, daß zwischen beiden Parasiten, obwohl sie phylogenetisch nicht verwandt sind, dennoch eine Wechselwirkung der Antigene bestehen könnte. Diese Vermutung kann aber noch nicht als bewiesen gelten, da keine Antigenanalyse vorgenommen wurde.

Bei den Versuchen zur Immunisierung der Mäuse gleichzeitig durch eine nasale Gabe von Acanthamoeba sp. SA und eine orale von Toxoplasma, zeigte sich eine bemerkenswerte Oberlebensrate von 56 %. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß von den 25 Versuchstieren bereits 9 gestorben waren, bevor 30 Tage nach der Immunisierung der Challenge erfolgen konnte. Der Plattentest, der nach dem Tod dieser Mäuse vorgenommen wurde, gab keinerlei Hinweis auf eine Amöbeninfektion. Es bleibt zu überlegen, welche Faktoren zum Tod der Tiere führten. Toxoplasma gondii Stamm KSU, mit dem die Tiere infiziert wurden, ist ein schwach virulenter Parasit. Da die Applikation von Toxoplasma und Akanthamöben am gleichen Tag erfolgte, besteht die Möglichkeit, daß dies, neben anderen Faktoren, zu einer zu hohen Belastung für die Tiere wurde.

Das gute Ergebnis von 56 % überlebender Mäuse nach dem Challenge führt zu der Oberlegung, ob eine chronische Infektion mit Toxoplasma, auf die nach einem verhältnismäßig langen Zeitraum eine Immunisierung mit Akanthamöben erfolgt, einen wesentlich besseren Schutz gegen eine spätere Infektion durch Akanthamöben bieten könnte.

Überträgt man dieses Modell auf die natürlichen Verhältnisse, bei denen etwa die Hälfte der Menschen irgendwann einmal mit Toxoplasma in Berührung kommt, dann könnte Toxoplasma zusätzlich zu der spezifischen Immunisierung durch ständigen Kontakt mit abgetöteten oder lebenden Amöben auch eine Schutzwirkung gegenüber pathogenen Amöben bewirken. Somit ist die Oberlegung nicht völlig von der Hand zu weisen, daß aufgrund dieser spezifischen - durch Amöben - und unspezifischen - durch Toxoplasma - Immunisierung viele Menschen gegen eine Infektion durch pathogene Amöben geschützt sind.

4.6. Immunisierung mit Bakterienzellwandantigenen (MDP, TDM)

Aus Bakterien gewonnene Produkte werden in zahlreichen Fällen zur Immunstimulanz angewendet. Umfassende Forschungsarbeiten über Bakterien haben gezeigt, daß in den Zellwänden einiger Bakterienstämme neben Glykolipiden auch Muramyldipeptid (MDP) und Trehalosedemycolat (TDM) enthalten sind. Diese ersteren kann man inzwischen synthetisch herstellen, und sie haben eine gewisse Bedeutung bei Immunisierungsversuchen erlangt.

Wie aus Untersuchungen mit synthetisch hergestelltem MDP hervorgeht, bewirken die Substanzen bei Versuchstieren einen beachtlichen Immuneffekt gegen verschiedene Bakterien-, Pilz- und Parasiteninfektionen.
Ähnliche Ergebnisse erzielte man mit TDM. KIERSZENBAUM & FERRARESI (1979)[62] erreichten gute Erfolge mit MDP, das sie

gegen eine Trypanosoma cruzi-Infektion bei Mäusen einsetzten. Bisher gab es jedoch noch keine Untersuchungen, ob MDP und TDM auch gegen eine Infektion durch pathogene Akanthamöben wirksam sein können.
Die hier durchgeführten Experimente machen deutlich, daß MDP und TDM durchaus einen beachtlichen Schutzeffekt gegen eine Infektion durch Akanthamöben bewirken.
Während von den 20 Kontrolltieren alle starben, überlebten nach der Immunisierung mit MDP 4 von 10 Versuchstieren. Bei der Immunisierung mit TDM überlebten 3 von 10 Versuchstieren. Die Behandlung mit beiden Substanzen zusammen, das heißt mit TDM und MDP, ergab hingegen, daß von 10 Versuchstieren nur ein einziges Oberlebte.

ADAMS et al. (1976)[1] konnten bei ihren Versuchstieren nach Behandlung mit Lipopolysacchariden aus Escherichia coli einen acht Tage langen Schutz gegen eine tödliche Naegleria-Infektion erreichen. Wie sich gezeigt hat, bietet eine Immunisierung mit MDP oder TDM als Vorbeugung gegen eine tödliche Akanthamöben-Infektion einen wesentlich besseren Schutz für die Versuchstiere. Hier spielt sicherlich bei der Schutzwirkung eine unspezifische Immunität durch Makrophagen eine Rolle.

MASIHI et al. (1984)[74] führten Versuche mit MDP und TDM zur Immunisierung von Mäusen gegen Grippe-Viren durch. Durch eine kombinierte Gabe von MDP und TDM konnten sie einen beachtlichen Schutz bei den Tieren erzielen. Behandelten sie die so immunisierten Mäuse jedoch anschließend mit Mitteln, die Makrophagen zerstören, fanden sie eine deutlich höhere Mortalitätsrate nach einer Influenza-Infektion.

Während gegen eine Virusinfektion die kombinierte Behandlung mit MDP und TDM eine hervorragende Schutzwirkung hervorrief, machen die hier besprochenen Versuche deutlich, daß die Behandlung mit nur einem der beiden Antigene bei einer Amöbeninfektion eine bessere Oberlebensrate ergab als die kombinierte

Behandlung mit MDP und TDM.

Bei diesen Versuchen wie auch bei denen mit anderen Parasiten ist deutlich geworden, daß neben der spezifischen Immunisierung auch die unspezifische Immunität eine bedeutende Rolle spielen kann. Es ist nicht auszuschließen, daß man eine sehr gute Schutzwirkung erzielen könnte, wenn man eine Immunisierung durch ein unspezifisches Immunstimulans und eine spezifische Immunisierung durch Antigene aus abgetöteten Amöben kombinieren könnte.

4.7. Beeinflussung der Immunreaktion durch Immunsuppressiva

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, starben alle Versuchstiere der Gruppe 6, das sind diejenigen Mäuse, die ohne vorherige Immunisierung mit pathogenen Amöben infiziert wurden. In Gruppe 5 - d. h. immunisierte Mäuse - überlebten sieben von 10 Mäusen (70 %) die pathogene Amöbeninfektion. Dies beweist, daß durch die vorhergehende Gabe von Antigenen von A-1 eine beachtliche Schutzwirkung erzielt worden war.

In den anderen Gruppen dieser Versuchsreihe zeigt sich eine höhere Mortalitätsrate, obwohl diese Tiere in gleicher Weise immunisiert worden waren wie die Tiere der Gruppe 5. Sie waren im Anschluß an die Immunisierung mit Immunsuppressiva behandelt worden, ehe sie mit pathogenen Amöben infiziert wurden.

Der Effekt der Immunsuppressiva tritt besonders deutlich nach der Behandlung mit Cyclophosphamid auf (Gruppe 1); hier überlebten von 10 Mäusen nur zwei. Eine ähnlich starke Herabsetzung der Schutzwirkung war bei Gruppe 4 zu beobachten, in der bei den nach einer Immunisierung mit Carragheenan behandelten Mäusen die Überlebensrate drei von 10 Tieren betrug.

In Gruppe 3, die mit Silica behandelt wurde, war die

Oberlebensrate vier von 10 Tieren, in Gruppe 2 hingegen sechs von 10 Tieren.

Cyclophosphamid (zyklisches Phosphorsäureesterdiamid-Derivat), ein alkylierendes Agens, beeinflußt die Zellproliferation, indem es ein "cross linking" der DNA verursacht. Es führt im allgemeinen zu einem starken Absinken der Leukozytenzahl. SCHWARTZ et al. (1978)[90] fanden bei ihren Untersuchungen mit Cyclophosphamid heraus, daß Cyclophosphamid vor allem zu einer Abnahme der Anzahl der T-Zellen führt, was eine Verringerung der Abwehrkraft des Körpers gegen eine Infektion bedeutet. Man darf voraussetzen, daß die hohe Mortalitätsrate der Mäuse in Gruppe 1 darauf zurückzuführen ist, daß durch die Behandlung mit Cyclophosphamid die vorher erfolgte Immunisierung unwirksam gemacht wurde. Cyclophosphamid verringerte durch seine zytostatische Aktivität die Zahl der sich schnell teilenden Lymphozyten, wodurch die Immunität der Tiere gesenkt wurde und eine für die Amöben günstige Situation entstand, so daß sie in die Gewebe vordringen konnten. Die Mortalitätsrate der Gruppen 3 und 4, die im Anschluß an eine Immunisierung mit Carragheenan bzw. Silica behandelt wurden, weist ebenfalls auf eine zytotoxische Wirkung dieser beiden Stoffe hin.

ALLISON et al. (1966)[2] wiesen durch ihre Untersuchungen nach, daß bei Mäusen durch Gaben von Silica und Carragheenan die meisten Makrophagen zerstört werden. Es zeigte sich, daß Silica und Carragheenan gezielt die Makrophagen angreifen. Man könnte annehmen, daß die im Vergleich zu Gruppe 5 verhältnismäßig niedrige Überlebensrate darauf zurückzuführen ist, daß Carragheenan und Silica bei den Versuchstieren ebenfalls die Makrophagen vernichteten, wodurch im Wirt günstige Bedingungen für die Amöben entstanden. Dies könnte als weiterer Hinweis angesehen werden, daß die Infektion vorwiegend auf hämatogenem Wege erfolgt.

In Gruppe 2, deren Versuchstiere im Anschluß an eine

Immunisierung mit Methylprednisolon behandelt wurden, war die Mortalitätsrate weniger hoch, es überlebten von 10 Versuchstieren sechs Mäuse. Methylprednisolon wird in der Kortikosteroidtherapie angewendet. Untersuchungen haben erbracht, daß hohe Gaben von Kortikosteroiden einen hemmenden Effekt auf die Immunreaktion haben.

Mit Akanthamöben-Infektionen bei Mäusen experimentierten auch MARKOWITZ et al. (1978)[67]. Sie beschäftigte hierbei auch das Problem, ob es sich bei Akanthamöben-Infektionen um opportunistische Erkrankungen handeln könnte. Bei Labortests versuchten sie, durch eine Behandlung mit Methylprednisolon und Tetrazyklin bei Mäusen eine Immunschwäche hervorzurufen, um herauszufinden, ob danach Erkrankungen durch eine Amöbeninfektion gehäuft auftreten würden. Sie experimentierten mit schwach virulenten Acanthamoeba castellanii.

Die Kontrolltiere blieben unbehandelt, von diesen Mäusen starb eine Maus (10 %). Zwei andere Gruppen von Mäusen behandelten sie mit Methylprednisolon bzw. Tetrazyklin. Es zeigte sich hier nach einer Infektion mit Akanthamöben, daß 50 % bzw. 60 % der Mäuse starben. MARKOWITZ et al.[67] zogen daraus den Schluß, daß es sich um eine opportunistische Erkrankung handelte.

Bei den hier besprochenen Versuchen wurde ebenfalls eine Gruppe von Versuchstieren mit Methylprednisolon behandelt (Gruppe 2). Hier betrug die Überlebensrate sechs von 10 Tieren. Es muß darauf hingewiesen werden, daß im Gegensatz zu den Versuchen von MARKOWITZ[67], der unbehandelten Mäusen Methylprednisolon gab und sie anschließend mit A. castellanii infizierte, bei dem genannten Versuch die Tiere vor der Methylprednisolon-Behandlung immunisiert wurden. Die Infektion erfolgte dann mit pathogenen Akanthamöben. Die im Vergleich zu Gruppe 1 niedrigere Mortalitätsrate könnte, neben der Stärke der Dosis, auch dadurch erklärt werden, daß der Zeitraum zwischen der Applikation der Antigene und der Anwendung

von Methylprednisolon zu lang war.

Es fällt auf, daß zwischen Erkrankungen durch Naegleria fowleri und den durch Akanthamöben ein großer Unterschied besteht. Naegleria fowleri befallen in der Regel gesunde jüngere Menschen, die mit durch Naegleria infiziertem Wasser in Berührung kommen. Die Amöben dringen über die Nase direkt in das Gehirn vor. Im Gegensatz dazu befallen Akanthamöben geschwächte Personen. Sie verursachen außerdem nicht in jedem Fall eine Hirnhautentzündung, sondern befallen auch andere Organe, wie z. B. die Lunge und die Augen.

MARTINEZ (1980)[71], der die Krankengeschichte von 15 Patienten untersuchte, die an GAE (granulomatöser Akanthamöben-Encephalitis) gestorben waren, stellte fest, daß die Patienten in allen Fällen zuvor durch eine Krankheit, durch Diabetes, Leberzirrhose, Lungenentzündung oder andere Krankheiten geschwächt waren. Als Ergebnis seiner Untersuchung scheint sich zu bestätigen, daß diese fakultativen Parasiten infolge eines Absinkens der Immunität des Wirtes in das Gewebe vordringen können. In allen von MARTINEZ untersuchten Fällen handelte es sich um eine opportunistische Amöbeninfektion, die gehäuft dann auftritt, wenn die Person z. B. mit einer hohen Dosis von Steroiden oder Antibiotika behandelt wurde. MARTINEZ (1980)[71] nimmt an, daß eine opportunistische Infektion dadurch erfolgen kann, daß die zelluläre Immunität unterdrückt wird.

Eine Unterstützung der Schlußfolgerungen von MARTINEZ (1980)[71] könnten auch die hier besprochenen Versuche bieten. Es hatte sich gezeigt, daß trotz einer aktiven Immunisierung eine hohe Mortalitätsrate nach einer Akanthamöben-Infektion auftrat, wenn die Immunität durch bestimmte Mittel beeinflußt worden war.

5. SCHLUSSBEMERKUNG

Die vorliegende Untersuchung zeigt am Modell der Maus, daß bei der Immunreaktion gegenüber einer Infektion mit Akanthamöben zahlreiche Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Es wurde deutlich, daß die Tiere mit lebenden und abgetöteten Amöben sowie auch mit Kulturüberstand aktiv immunisierbar sind. Eine Immunisierung mit anderen Erregern zeigte ebenfalls einen gewissen Schutzeffekt. Es hat den Anschein, als sei sowohl eine spezifische wie auch eine unspezifische Immunität gegenüber den Erregern erzielbar. Möglicherweise verläuft die Reaktion beim Menschen ähnlich.

In unserer Umwelt kommen wir ständig in Kontakt mit lebenden oder abgetöteten Akanthamöben. Dies bewirkt wahrscheinlich im Laufe der Zeit eine gewisse Immunität. Ebenso nehmen wir ständig andere Mikroorganismen in uns auf, die ebenfalls zu einer Immunität gegenüber Akanthamöben beitragen. Auf diese spezifische und unspezifische Schutzwirkung dürfte es zurückzuführen sein, daß es nicht zu einem häufigeren Auftreten der Erkrankungen kommt, wenngleich überall in unserer Umwelt Akanthamöben vorhanden sind.

Da durch Behandlung mit bestimmten Antigenen eine gute Schutzwirkung erzielt wurde, könnte u. U. auch eine Schutzimpfung als Vorbeugung gegen mögliche Erkrankungen in Erwägung gezogen werden.

Andererseits zeigen die Experimente, bei denen die Tiere nach einer vorhergehenden Immunisierung mit Immunsuppressiva behandelt wurden, eine erhöhte Letalität. Ein Beispiel hierfür ist die Behandlung mit Cyclophosphamid, das ein Absinken der zellulären Immunität bewirkte und für ein besonders starkes Ansteigen der Mortalität verantwortlich war.

Hier läßt sich eine Verbindung herstellen zu jenem Personen-

kreis, bei dem eine Immunschwäche auftritt. Aus diesem Kreis werden in den letzten Jahren insbesondere die Verhältnisse bei AIDS-Kranken diskutiert. Kürzlich wurde berichtet, daß ein AIDS-Kranker nach Infektion mit Akanthamöben starb (GONZALES et al. 1984)[47].

Zu anderen Gruppen, die durch Akanthamöben besonders gefährdet sind, gehören Alkoholiker und Diabetiker (MARTINEZ 1982)[72]. Aus den Experimenten von MARKOWITZ et al. (1978)[67] wird ersichtlich, daß auch Antibiotika, wie z. B. Tetrazyklin, zu einer opportunistischen Infektion durch Akanthamoben führen können. MARKOWITZ ging davon aus, daß auf der Nasenschleimhaut gesunder Menschen Akanthamöben zu finden seien, die sich von den auf der Schleimhaut befindlichen Bakterien ernähren. Da nach einer Behandlung mit Antibiotika diese Bakterien abgetötet sind, sei das ökologische Gleichgewicht gestört. Ihrer natürlichen Nahrung beraubt, dringen die Akanthamöben daher in das menschliche Gewebe ein.

Noch scheint beim Menschen eine weitverbreitete Immunität gegenüber Akanthamöben zu bestehen, obwohl einige Todesfälle auf Akanthamöben zurückzuführen sind. Das bestehende Gleichgewicht Wirt - Parasit verhinderte bisher eine weite Verbreitung von Erkrankungen. Man darf jedoch nicht außer acht lassen, daß durch die zunehmende Umweltbelastung in vielen Ländern der Erde Selektionsvorteile der pathogenen freilebenden Amöben entstehen könnten. Andererseits könnte das Gleichgewicht aber auch durch einen übermäßigen Gebrauch einiger Arzneimittel oder auch durch andere Faktoren gestört werden, wodurch eine Gefahr für den Menschen entsteht. Bisher ist jedoch zu wenig über die durch Akanthamöben verursachten Infektionen bzw. über eine entsprechende Immunität bekannt.

Wie aus der vorliegenden Arbeit ersichtlich, stehen wir erst am Anfang einer gründlichen Erforschung der Akanthamöben. Vielleicht könnte sie zum Anstoß für eine intensivere

Beschäftigung mit den Amöben, mit ihren Lebensbedingungen und den Möglichkeiten zu einer eventuellen Abwehr werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Freilebende Amöben der Gattung Acanthamoeba sind überall verbreitet. Einige Arten von Acanthamoeba sind die Erreger der tödlich verlaufenden granulomatösen Amöbenencephalitis (GAE), die vorzugsweise bei geschwächten Personen oder nach Behandlung mit Immunsuppressiva auftritt. Trotz der weiten Verbreitung dieser Amöben wird nur von wenigen Krankheitsfällen von GAE berichtet. Es ist anzunehmen, daß - abgesehen von der jeweiligen Amöbenart bzw. -stamm - die Immunität des Wirtes bei der Resistenz gegenüber einer Infektion durch diese Organismen eine bedeutende Rolle spielt.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war, am Modell der Maus zu prüfen, ob lebende nichtpathogene sowie abgetötete pathogene und nichtpathogene Amöben oder andere Mikroorganismen einen Schutz gegenüber pathogenen A. culbertsoni A-1 bewirken konnen. In einem weiteren Experiment wurden immunisierte Mäuse mit Immunsuppressiva, wie Cyclophosphamid, Methylprednisolon, Silica, Carragheenan, behandelt im Hinblick auf eine Beeinflussung der Immunreaktion gegenüber einer Infektion mit A. culbertsoni A-1.
Folgende Stämme von Acanthamoeba dienten zur Immunisierung: A. lugdunensis SH-565, A. castellanii X-133, A. sp. WB, A. sp. SA.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Überlebensrate der Mäuse nach einer einmaligen Immunisierung i.n. mit lebenden nichtpathogenen Amöben deutlich erhöht war (24 - 48 %) im Vergleich mit den nicht immunisierten Kontrollen (0 %). Eine vierfache Immunisierung mit abgetöteten pathogenen bzw. mit nichtpathogenen Amöben ergab einen besseren Schutzeffekt. Die Überlebensrate betrug zwischen 48 % und 64 % im Gegensatz zu 0 % bei den Kontrollen. Von Mäusen, die viermal mit 25 µl Kulturüberstand immunisiert wurden, konnten 16 % (A-1) bzw. 20 % (SA) im Vergleich zu 0 % der Kontrollen überleben. Nach Behandlung der Tiere mit Toxoplasma gondii, BCG oder

T. gondii + nichtpathogenen Amöben war eine beachtliche Schutzwirkung nach dem Challenge mit A-1 zu verzeichnen mit Überlebensquoten von 28 % bis 56 % gegenüber 4 % bei den Kontrollen. Eine Behandlung von Mäusen i.v. mit Bakterienzellwandkomponenten, wie Muramyldipeptid (MDP) und Trehalosedemicolat (TDM), führte zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber A-1; die Überlebensrate lag bei 40 % (MDP), 30 % (TDM), 10 % (MDP + TDM), 0 % (Kontrolle). Tiere, die eine vierfache Immunisierung i.n. mit A-1 und nachfolgend eine Behandlung mit mehreren Immunsuppressiva erhalten hatten, zeigten nach dem Challenge mit A-1 eine höhere Mortalitätsrate als die ausschließlich mit A-1 immunisierten Tiere. (40 % - 80 % gegenüber 30 % Kontrollen).

Diese Befunde deuten an, daß der Mensch durch den häufigen Kontakt mit nichtpathogenen Amöben und Fraktionen von abgetöteten pathogenen Amöben sowie anderen Mikroorganismen eine Immunität gegenüber pathogenen Amöben aufbaut. Eine Immunschwäche oder Anwendung von Immunsuppressiva wirken sich begünstigend auf die Erreger aus und führen zum Auftreten von Erkrankungen.

SUMMARY

Free living amoeba of genus Acanthamoeba are ubiquitous organisms. Several species of Acanthamoeba cause fatal granulomatous amoebic encepnalitis (GAE). It occurs principally in chronically ill, debilitated or immunocompromised individuals. Despite its ubiquitous presence and high rate of human exposure, only few number of cases of GAE have been reported. Beside the species and strain of the parasites it is possible that the host immunity can play an important role in resistance to infection.

This study was undertaken to examine whether living non-pathogenic as well as killed pathogenic and non-pathogenic amoeba or other microorganisms can induce protective immunity against pathogenic A. culbertsoni A-1 by using mice as a model. Another experiment has been done to determine if immunized mice treated with immunosuppressive agents, like Cyclophosphamide, Methylprednisolon, Silica, Carragheenan, would alter host response to challenge with A. culbertsoni A-1. The following Acanthamoeba strains were used for immunization: A. lugdunensis SH-565, A. castellanii X-133, A. sp. WB, A. sp. SA.

The results show that i.n. immunization with a single dose of living non-pathogenic amoeba produced a survival rate of 24 - 48 % of mice compared to 0 % in non-immunized controls. Immunization with four doses of non-living pathogenic and non-pathogenic amoeba resulted in better protective immunity. The rate of survival varied between 44 % - 64 % compared to 0 % of controls. Mice immunized with four doses of 25 µl of amoeba free culture supernatant produced a survival of 20 % (SA) and 16 % (A-1) compared to none of controls.

Infection of mice with Toxoplasma gondii, BCG and T. gondii + non-pathogenic amoeba provided good protection against challenge with A-1. The rate of survival was 28 - 56 % and

4 % of the controls. It has also been found that treatment of mice intravenously with components of bacterial cell wall like muramyldipeptide (MDP) and trehalosedemicolate (TDM) could enhance the resistance against A. culbertsoni A-1. The rate of survival was 40 % (MDP), 30 % (TDM), 10 % (MDP + TDM), 0 % controls. Mice intranasally immunized with four doses of A-1 and receiving several immunosuppressive agents were found to show greater mortality rate after challenge with A-1 than those immunized by receiving only i.n. A-1 (40 % - 80 % compared to 30 % of controls).
These findings suggest that the frequent exposure of humans to the antigenically related nonpathogenic amoeba and fractions of non-living pathogenic amoeba and other microorganisms may immunize them against pathogenic amoeba. Immundeficiency or immunosuppressive agents provoke the activation of the organisms leading to establishment of diseases.

LITERATURVERZEICHNIS

1 ADAMS A.C., D.T. JOHN, S.G. BRADLEY,
Modification of resistance of mice to Naegleria fowleri infections,
Infect. Immun., 13: 1387 - 1391 (1976)

2 ALLISON A.C., J.S. HARRINGTON, M. BIRBECK,
An examination of the cytotoxic effects of Silica on macrophages,
J. Exp. Med., 124: 141 - 153 (1966)

3 ARAUJO F.G., E. NASCIMENTO,
Trypanosoma cruzi infection in mice chronically infected with Toxoplasma gondii,
J. Parasitol., 63: 1120 - 1121 (1977)

4 AYERS K.M., L.H. BILLUPS, F.M. GARNER,
Acanthamoebiasis in a dog,
Vet. Pathol., 9: 221 - 226 (1972)

5 BRASS K.,
Primäre Amöben-Meningoenzephalitis,
Dtsch. med. Wschr., 97: 1983 - 1985 (1972)

6 BROWN T.J., T.M. CURSON,
Pathogenic free living amebas (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway,
Scand. J. Infect. Dis., 9: 237 - 240 (1977)

7 BUTT C.G.,
Primary amebic meningoencephalitis,
New. Eng. J. Med., 274: 1473 (1966)

8 BUTT C.G., C. BARO, R. KNORR,
Naegleria (sp.) identified in amebic encephalitis,
Amer. J. Clin. Pathol., 50: 568 - 574 (1968)

9 CARTER R.F.,
Primary amoebic meningo-encephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases,
J. Pathol. Bact., 96: 1 - 25 (1968)

10 CARTER R.F.,
Description of a Naegleria sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis and of the experimental pathological changes induced by it,
J. Pathol., 100: 217 - 244 (1970)

11 CARTER R.F.,
Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge,
Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene, Ordinary Meeting, 20th January 1972

12 CASTELLANI A.,
An amoeba growing in cultures of a yeast,
J. Trop. Med. Hyg., 33: 188 - 191 (1930)

13 CERVA L., K. NOVAK, C.G. CULBERTSON,
An outbreak of acute fatal amebic meningoencephalitis,
Amer. J. Epidemiol., 88: 436 - 444 (1968)

14 CERVA L.,
Experimental infection of laboratory animal by the pathogenic Naegleria gruberi strain Vitek,
Folia Parasitol., 18: 171 - 176 (1971)

15 CERVA L.,
Naegleria-Amöben und primäre Amöben-Meningoenzephalitis,
Merkblätter über angewandte Parasitenkunde und Schädlingsbekämpfung, 16: 1 - 12 (1975)

16 CHANDRA R.K.,
Immune response in parasitic diseases. Part B: Mechanisms,
Rev. Infect. Dis., 4: 756 - 762 (1982)

17 CHANG L.Sh.,
Small, free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis, and resistance,
Curr. Top. Comp. Pathobiol., 1: 201 - 254 (1971)

18 CHANG L.Sh.,
Cytopathic and pathogenic differences among different geographic strains of pathogenic Naegleria and bearing on the epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis,
Presented at 3rd Int. Cong. Parasit. München 1974

19 CLARK I.A., A.C. ALLISON,
Protection of mice against Babesia and Plasmodium with BCG,
Nature, 259: 309 - 311 (1976)

20 CLARK I.A., E.J. WILLS, J.E. RICHMOND, A.C. ALLISON,
Suppression of Babesiosis in BCG infected mice, its correlation with tumor inhibition,
Infect. Immun., 1: 430 - 438 (1977)

21 COX F.E.G.,
Specific and nonspecific immunization against parasite infections,
Nature, 273: 623 - 625 (1978)

22 CRUMP L.M.,
The influence of the bacterial environment on the excystment of amoeba from soil,
J. Gen. Microbiol., 4: 16 - 21 (1950)

23 CULBERTSON C.G., J.W. SMITH, J.R. MINNER,
Acanthamoeba: observation on animal pathogenicity,
Science, 127: 1506 (1958)

24 CULBERTSON C.G., J.W. SMITH, H.K. COHEN, J.R. MINNER,
Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba,
Amer. J. Pathol., 35: 185 - 197 (1959)

25 CULBERTSON C.G.,
The pathogenicity of soil amebas,
Ann. Rev. Microbiol., 25: 231 - 254 (1971)

26 CURSON R.T.M., T.J. BROWN, E.A. KEYS, K.M. MORIARTY, D. TILL,
Immunity to pathogenic free living amoeba: role of humoral immunity,
Infect. Immun., 29: 401 - 407 (1980)

27 CURSON R.T.M., T.J. BROWN, E.A. KEYS, K.M. MORIARTY, D. TILL,
Immunity to pathogenic free living amoeba. Role of cell mediated immunity,
Infect. Immun., 29: 408 - 410 (1980)

28 DE JONCKHEERE J.F.,
Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von Amöben der Gattung Naegleria in künstlich erwärmten Gewässern Belgiens,
Bundesgesundheitsblatt, 21: 216 (1968)

29 DE JONCKHEERE J., P. VAN DIJCK, H. VANDEVOORDE,
The effect of thermal pollution on the distribution of Naegleria fowleri,
J. Hyg. Camb., 75: 7 - 13 (1975)

30 DE JONCKHEERE J.F.,
The changes of virulence of different N. fowleri isolates in axenic culture,
Int. Congr. Parasit. Warszawa 1978

31 DE JONCKHEERE J.F.,
Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different Acanthamoeba spp.,
Appl. Environ. Microbiol., 39: 681 - 685 (1980)

32 DEMPE S.,
Subakut- bis chronische-granulomatöse Meningoencephalitis bei Mäusen nach experimenteller intranasaler Infektion mit Naegleria fowleri,
Dissertation, FU Berlin, 1980

33 DEMPE S., A.J. MARTINEZ, K. JANITSCHKE,
Subacute and chronic meningoencephalitis in mice after experimental infection with a substrain of low virulence,
Infection, 10: 5 - 8 (1982)

34 DIFFLEY P., M.R. SKEELS, F. SOGANDARES-BERNAL
Delayed type hypersensitivity in guinea pigs infected subcutaneously with Naegleria fowleri Carter,
Z. Parasitenk., 49: 133 -137 (1976)

35 DOFLEIN, F., E. REICHENOW,
Lehrbuch der Protozoenkunde,
Gustav Fischer Verlag Jena, 1953, 6. Aufl.

36 DUJARDIN F.,
Histoire naturelle des zoophytes infusoires,
Libraire Encyclopedique de Roret (Paris), 1841

37 DWIVEDI R.J., B.N. SINGH,
Pulmonary lesions in an Indian buffalo associated with Acanthamoeba sp.,
Indian J. Microbiol., 5: 31 - 34 (1965)

38 ELSON C., R.P. GEYER, R.S. CHANG,
A lecithinase from the amoeba Hartmanella rhysodes,
J. Protozool., 17: 440 - 445 (1970)

39 FERRANTE A., Y.H. THONG,
Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in Naegleria fowleri,
Int. J. Parasitol., 9: 559 - 601 (1979)

40 FERRANTE A., B. ROWAN-KELLY,
Activation of the alternative pathway of complement by Acanthamoeba culbertsoni,
Clin. Exp. Immunol., 54: 477 - 485 (1983)

41 FERRANTE A., C. SMYTH,
Mitogenicity of Naegleria fowleri extract for murine T-lymphocytes,
Immunol., 51: 461 - 467 (1984)

42 FOWLER M., R.F. CARTER,
Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp. A preliminary report,
Brit. Med. J., 2: 740 (1965)

43 FRANK L., Y.F. LIEW,
Differential sensitivity to cyclophosphamide of helper T-cells for humoral responses and suppressor T-cells for delayed type hypersensitivity,
Eur. J. Immunol., 10: 480 - 483 (1980)

44 GENTRY L.O., J.S. REMINGTON,
Resistance against Cryptococcus conferred by intracellular bacteria and protozoa,
J. Infect. Dis., 123: 22 (1971)

45 GHADRIAN, E., P.A.L. KONGSHAVEN,
Effect of Silica on resistance of mice to Entamoeba histolytica infection,
Infect. Immun., 45: 399 - 402 (1984)

46 GOGATE A., B.N. SINGH, L.P. DEODHAR, H.I. JHALA,
Primary amoebic meningo-encephalitis caused by Acanthamoeba,
J. Postgrad. Med., 30: 125 - 128 (1984)

47 GONZALES M.M., E.W. GOULD, G.M. DICKINSON, G.S. VISVESVARA, A.J. MARTINEZ, T.J. CLEARY, G.T. HENSLEY
Acanthamoeba castellanii infection in an AIDS patient. Pathogenesis and diagnostic methodology,
College of American pathologists, American society of clinical pathologists, Proc. Annual Meeting, New Orleans 1984

48 GRIFFIN J.L.,
Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free living amoeba,
Science, 178: 869 - 870 (1972)

49 GRIFFIN J.L.,
The pathogenic amoeboflagellate Naegleria fowleri: Environmental isolations, competitors, ecologic interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis,
J. Protozool., 30: 403 - 409 (1983)

50 HAGGERTY R.M., D.T. JOHN,
Innate resistance of mice to experimental infection with Naegleria fowleri,
Infect. Immun., 20: 73 - 77 (1978)

51 HAGGERTY R.M., D.T. JOHN,
Serum agglutination and immunglobulin levels of mice infected with Naegleria fowleri,
J. Protozool., 29: 117 - 122 (1982)

52 HIRST L.W., W.R. GREEN, W. MERZ, C. KAUFMANN, G.S. VISVESVARA, A. JENSEN, M. HOWARD,
Management of Acanthamoeba keratitis. A case report and review of the literature,
Ophtalmol., 91: 1105 - 1111 (1984)

53 JAHNES W.G., H.M. FULLMER,
Free living amoeba as a contaminants in monkey kidney tissue culture,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96: 484 (1957)

54 JANITSCHKE K.,
Primäre Amöben-Meningoenzephalitis,
Bundesgesundheitsblatt, 10: 315 - 317 (1982)

55 JANITSCHKE K., S. LICHY, C. WESTPHAL,
Untersuchung von künstlich erwärmten Gewässern auf freilebende Amöben und deren Prüfung auf mögliche pathogene Eigenschaften,
Zbl. Bakt. Hyg., 176: 160 - 166 (1982)

56 JANITSCHKE K., S. LICHY, U. THALMANN,
Versuche über die Pathogenität von aus Gewässern isolierten Acanthamöben,
Zbl. Bakt. Hyg., 177: 350 - 358 (1983)

57 JEON KWANG W.,
The biology of amoeba,
Academic Press, New York - London 1973

58 JOHN D.T., R.R. WEIK, A.C. ADAMS,
Immunization of mice against Naegleria fowleri infection,
Infect. Immun., 16: 817 - 820 (1977)

59 JOHN D.T., S.L. NUSSBAUM,
Naegleria fowleri infection acquired by mice through swimming in amoeba-contaminated water,
J. Parasitol., 69: 871 - 874 (1983)

60 JONES D.B., G.S. VISVESVARA, N.M. ROBINSON,
Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis,
Trans. Ophtal. Soc. U. K., 95: 221 - 232 (1975)

61 KEUSCH G. T.,
Immune responses in parasitic diseases. Part A: General concepts,
Rev. Infect. Dis., 4: 751 - 755 (1982)

62 KIERSZENBAUM F., R.W. FERRARESI,
Enhancement of host resistance against Trypanosoma cruzi infection by immunoregulatory agent muramyl dipeptide,
Infect. Immun., 25: 273 - 278 (1979)

63 KUHN R.E., R.T. VAUGHN, G.A. HERBST,
The effect of BCG on the course of experimental Chagas disease in mice,
Int. J. Parasitol., 5: 557 - 560 (1975)

64 KRAJEWSKI A.S., H. WYLLIE,
Inhibition of human T lymphocyte colony formation by methyl-prednisolon,
Clin. Exp. Immunol., 46: 206 - 213 (1981)

65 LAWANDE R.V., A.E. OGUKANMI, E.J. EGLER,
Prevalence of pathogenic free living amoeba in Zaria, Nigeria,
Ann. Trop. Med. Parasitol., 73: 51 - 56 (1979)

66 LAWANDE R.V., J.T. MCFARLANE, W.R.S. WEIR, C. AWUNOR-RENNER,
A case of primary amebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer,
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 29: 21 - 25 (1980)

67 MARKOWITZ S.M., T. SOBIESKI, A.J. MARTINEZ, R. DUMA,
Experimental Acanthamoeba infections in mice pretreated with methyl-prednisolon or tetracycline,
Amer. J. Pathol., 92: 733 - 744 (1978)

68 MARTINEZ A.J., S.M. MARKOWITZ, R. DUMA,
Experimental pneumonitis and encephalitis caused by Acanthamoeba in mice: Pathogenesis and ultrastructural features,
J. Infect. Dis., 131: 692 - 699 (1975)

69 MARTINEZ A.J., C.S. AVILA, J.G. TAMAYO, J.T. MORON, E. WILLAERT, W.P. STAMM,
Meningoencephalitis due to Acanthamoeba sp.,
Acta neuropathol. (Berl.), 37: 183 - 191 (1977)

70 MARTINEZ A.J., K. JANITSCHKE,
Amöbenenzephalitis durch Naegleria und Akanthamoeba, Vergleich und Gegenüberstellung der Organismen und der Erkrankung,
Immun. Infekt., 7: 57 - 64 (1979)

71 MARTINEZ A.J.,
Is Acanthamoeba encephalitis an opportunistic infection?
Neurology, 30: 567 - 574 (1980)

72 MARTINEZ A.J.,
Acanthamoebiasis and Immunosuppression: A case report,
J. Neuropath. Exp. Neurol., 41: 548 - 557 (1982)

73 MARTINEZ A.J.,
Free living amoeba: Pathogenic aspects, a review,
Protozool. abstracts, 7: 293 - 306 (1983)

74 MASIHI K.N., W. BREHMER, I. AZUMA, W. LANGE, S. MOLLER,
Stimulation of chemiluminescence and resistance against aerogenic influenza virus infection by synthetic muramyl dipeptide combined with trehalose dimycolate,
Infect. Immun., 43: 233 - 237 (1984)

75 MASIHI K.N., W. BREHMER, W. LANGE, E. RIBI, S. SCHWARTMANN,
Protective effect of muramyl dipeptide analogue in combination with trehalose dimycolate against aerogenic influenza virus and Myobacterium tuberculosis infection in mice,
J. Biol. Resp. Modif., 3: 663 - 671 (1984)

76 MEDLEAU L., D.L. DAWE, C.A. CALVERT,
Immunosuppressive effects of cyclophosphamide, veneristine and L asparaginase in dogs,
Am. J. Vet. Res., 44: 176 - 179 (1983)

77 MISRA S.K., A.D. SHARMA, H. MEHDI, N.K. GARG,
Phospholipase A and lipid contents in pathogenic and non-pathogenic Acanthamoeba spp. in relation to their virulence,
Protistologica, 19: 513 - 521 (1983)

78 PAGE F.C.,
Taxonomic criteria for limax amoebae with description of 3 new species of Hartmanella 3 of Vahlkampfia,
J. Protozool., 14: 499 - 521 (1967a)

79 PAGE F.C.,
Reidentification of the genus Acanthamoeba with description of 3 species,
J. Protozool., 14: 709 - 724 (1967b)

80 PAGE F.C.,
Publ. Fresh-water Biol. Ass. Sc., 34 (1976)

81 PATRAS D., J.J. ANDUJAR,
Meningoencephalitis due to Hartmanella (Acanthamoeba),
Am. J. Clin. Pathol., 46: 226 - 233 (1966)

82 PHILIPPS B.P.,
Naegleria: Another pathogenic ameba studies in germfree guinea pig,
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 23: 850 - 855 (1974)

83 REILLY M.F., K.L. WHITE, S.G. BRADLEY,
Host resistance of mice to Naegleria fowleri infections,
Infect. Immun., 42 (2): 645 - 652 (1983)

84 REMINGTON J.S., J.L. KRAHENBUHL, J.W. MENDENHALL,
A role of activated macrophages in resistance to infection with Toxoplasma,
Infect. Immun., 6 (5): 829 - 834 (1972)

85 ROWAN-KELLY, B., A. FERRANTE,
Immunization with killed Acahnthamoeba culbertsoni antigen and amoeba culture supernatant antigen in experimental Acanthamoeba meningoencephalitis,
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78: 179 - 182 (1984)

86 RUSKIN J., J.S. REMINGTON,
Immunity and intracellular infection: Resistance to bacteria in mice infected with a protozoan,
Science, 160: 72 - 74 (1968)

87 RUSKIN J., J. MCINTOSH, J.S. REMINGTON,
Studies on the mechanism of resistance to phylogenetically diverse intercellular organisms,
J. Immunol., 103 (2): 252 - 259 (1969)

88 SCHARDINGER F.,
Entwicklungskreis einer Amoeba lobosa (Gymnyamoeba): Amoeba gruberi,
Sitzungsberichte Akad. Wiss. Wien, 108: 713 - 735 (1899)

89 SCHAUDINN F.,
Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoda,
Arb. Kaiser. Gesundh. Amt, 19: 547 - 576 (1903)

90 SCHWARTZ A., P. ASKENASE, R. GERSHON,
Regulation of delayed type hypersensitivity, reactions by cyclophosphamide sensitive T cells,
J. Immunol., 121 (4): 1573 - 1577 (1978)

91 SCHWARTZBERG J.F., J.L. KRAHENBUHL, J.S. REMINGTON,
Dichotomy between macrophage activation and degree of protection against Listeria monocytogenes and Toxoplasma gondii in mice stimulated with Corynebacterium parvum,
Infect. Immun., 12: 1037 - 1043 (1975)

92 SIDDIQUI A.W., W. BALAMUTH,
Serological comparison of selected parasitic and free living amoeba in vitro using diffusion-precipitation and fluorescent antibody technics,
J. Protozool., 13 (1): 175 - 182 (1965)

93 SINGH B.N., S.R. DAS,
Studies on pathogenic and non-pathogenic small free living amoebae and the bearing of nuclear division of the classification of the order Amoebida,
Phil. Trans. R. Soc. B. Sci., 259: 435 - 476 (1970)

94 SINGH B.N.,
Classification of amoeba belonging to the order Amoebida with special reference to pathogenic free living forms,
Current Science, 41: 395 - 433 (1972)

95 SINGH B.N., A.K. SHARMA,
Antigenic relationship among seven species of Acanthamoeba using immobilization and gel-diffusion precipitin test,
Indian J. Parasitol., 7 (2): 149 - 163 (1983)

96 SINGH B.N., G.D.P. DUTTA,
Small free living aerobic amoebae: Soil as a suitable habitat, isolation, culture, classification, pathogenicity, epidemiology and chemotherapy,
Indian J. Parasitol., 8 (1): 1 - 23 (1984)

97 SHAPRIO M.A., M.H. KAROL, G. KELETI, J.L. SYKORA, A.J. MARTINEZ,
The role of free living amoebae occuring in heated effluents as a causative agent of human disease,
Wat. Sci. Tech., 15: 135 - 147 (1983)

98 STEVENS A.R., R.L. TYNDALL, C.C. COUNTANT, E. WILLAERT,
Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters,
Appl. Environ. Microbiol., 34 (6): 701 - 705 (1977)

99 SYMMERS W.S.C.,
Primary amoebic meningoencephalitis in Britain,
Brit. Med. J., 4: 449 - 454 (1969)

100 THONG Y.H., A. FERRANTE, C. SHEPHERD, B. ROWAN-KELLY,
Resistance of mice to Naegleria meningoencephalitis transferred by immune serum,
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 72 (6): 650 - 652 (1978)

101 THONG Y.H., C. SHEPHERD, A. FERRANTE, B. ROWAN-KELLY,
Protective immunity to Naegleria fowleri in experimental amebic meningoencephalitis,
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 27 (2): 238 - 240 (1978)

102 THONG Y.H., A. FERRANTE, N. ROWAN-KELLY, D. O'KEEFE,
Immunization with culture supernatant in experimental meningoencephalitis,
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 73: 684 - 685 (1979)

103 THONG Y.H., A. FERRANTE, B. ROWAN-KELLY, D. O'KEEFE,
Immunization with live amoeba, amoebic lysate and cultural supernatant in experimental Naegleria meningoencephalitis,
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74 (5): 570 - 575 (1980)

104 THONG Y.H., R.F. CARTER, A. FERRANTE, B. ROWAN-KELLY,
Site of expression of immunity to Naegleria fowleri in immunized mice,
Parasit. Immunol., 5: 67 - 76 (1983)

105 VISVESVARA G.S., W. BALAMUTH,
Comparative studies on related free living and pathogenic amoeba with special reference to Acanthamoeba,
J. Protozool., 22 (2): 245 - 256 (1975)

106 WELLS R.T.,
Aerial contamination as a fallacy in the study of amoebic infections by cultural methods,
Parasitol., 41: 204 - 219 (1911)

Lebenslauf

5.5.1952	geboren in Kalkutta/Indien als Sohn des Angestellten Sailesh Chandra Bhaduri und seiner Ehefrau Renuka Bhaduri
1957-1961	Besuch der Grundschule in Kalkutta
1961-1968	Besuch der Oberschule in Kalkutta mit dem Abschluß Higher Secondary Examination
1968-1971	Studium am College der Universität Kalkutta
1971	Erlangung des Grades "B.Sc. (Honours) in Physiology" der University of Calcutta
1972	Berufliche Tätigkeit in Kalkutta
1973-1974	Labortechnische Ausbildung an der Calcutta School of Tropical Medicine mit dem Abschluß D.L.T. (Diploma in Laboratory Techniques)
1975-1976	Sprachkurs (Deutsch) an der Freien Universität Berlin
1976-1982	Studium an der Freien Universität Berlin in der Fachrichtung Biologie
1982	Erlangung des Grades eines Diplombiologen
ab 1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Robert-Koch-Institut Berlin, Abteilung Klinische Parasitologie

1985	Während der Promotionsarbeit einige Monate Tätigkeit als Wissenschaftler im Rahmen eines Werkvertrages im Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene (Abteilung Baktèriologie) in Berlin Leitung der Lehrveranstaltung "Praktikum: Biologie für Mediziner" (Teil Mikrobiologie) an der FU Berlin
8.5.1980	Eheschließung mit Barbara Bhaduri, geb. Grycz

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen